

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06577

研究課題名(和文) Development of Sulfo-Sialic Acids into Next-Generation Antimicrobial Agents

研究課題名(英文) Development of Sulfo-Sialic Acids into Next-Generation Antimicrobial Agents

研究代表者

ヴァヴリッカ クリストファー (Vavricka, Christopher)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・准教授

研究者番号：20809199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前、2,3-ジフルオロシアル酸(1)を、インフルエンザシリアダーゼの不可逆的阻害剤として設計した(図1)。この不可逆的阻害剤の改善を目指し、我々は文献1と2を参考に、アノマー位置換アナログ4と5を設計した(図1,2)。ホスホノ体2とスルホ体3の合成は達成したが、これらへのフルオロ基の導入は困難であった。そこで、本研究では、シアル酸アナログのC-1およびC-2位へのフルオロ基の導入法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

このプロジェクトで開発した化合物群は、将来の感染爆発(パンデミック)に備えた抗ウイルス薬リードとして役立つものです。そして、薬剤耐性を獲得した微生物・ウイルスにも幅広く効果を示す可能性を持っています。さらには、本化合物群の微生物生産システムも構築しました。本手法は、従来、高価な医薬品製造のために行っていた工業化学的プロセスを代替する持続可能な手段となり得ます。

研究成果の概要(英文)：Fluorinated sulfonates and phosphonates were designed as inhibitors of sialic acid binding viruses. Three milestones were reached to produce target sialic acid analogues: 1) C-2 fluorine introduction into pyranose analogues, 2) introduction of fluorine and hydroxy groups into C-1 and C-2 positions of open-chain analogues, and 3) substitution of the sialic acid anomeric carboxy with a sulfonamide group.

研究分野：Medicinal Chemistry

キーワード：Synthetic biology Sulfo-sialic acid Fluorine Covalent inhibitor Neuraminidase (NA) Antivirals Anomeric sulfo Anomeric phosphono

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

The current coronavirus pandemic emphasizes the urgency of antiviral drug design. Influenza also spreads rapidly as seen during the H1N1 pandemics of 1918 and 2009.

現在進行下の新型コロナウイルスのパンデミックにより、抗ウイルス薬設計の緊急性が再認識されている。インフルエンザも同じく、1918年と2009年のH1N1型のパンデミックから分かるように、伝染速度は極めて速い。

## 2. 研究の目的

2,3-Difluorosialic acid (**1**) was previously developed as a covalent inhibitor of influenza neuraminidase (NA) (Figure 1). To improve covalent inhibitors further, analogues **4** and **5** were designed with substituted anomeric groups according to references 1 and 2 (Figures 1 and 2). Phosphono analogue **2** and sulfo analogue **3** could be synthesized, but both are difficult to fluorinate. In this project, strategies were developed to introduce fluorine at the C-1 and C-2 positions of target sialic acid analogues.

我々は以前、2,3-ジフルオロシアル酸(1)を、インフルエンザシアリダーゼの不可逆的阻害剤として設計した(図1)。この不可逆的阻害剤の改善を目指し、我々は文献1と2を参考に、アノマー位置換アナログ4と5を設計した(図1,2)。ホスホノ体2とスルホ体3の合成は達成したが、これらへのフルオロ基の導入は困難であった。そこで、本研究では、シアル酸アナログのC-1およびC-2位へのフルオロ基の導入法を開発した。

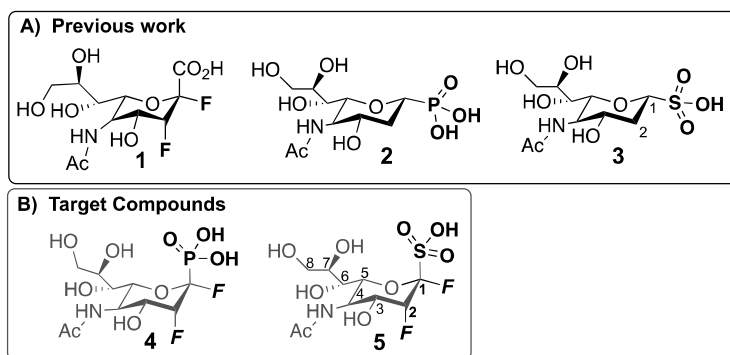


Figure 1 Key model compounds (A) and target compounds (B) of this project.

鍵となるモデル化合物(A)および本研究の目的化合物(B)

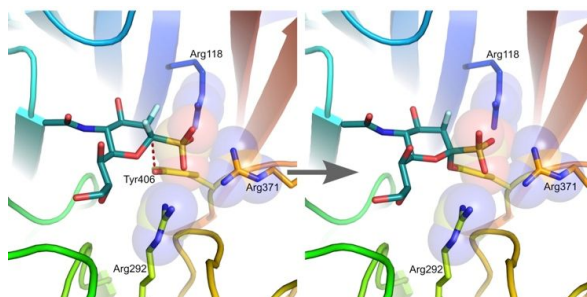


Figure 2 Proposed covalent inhibition of influenza neuraminidase (NA) by 5.

目的化合物5によるインフルエンザシアリダーゼの推定阻害機構

### 3. 研究の方法

First, a synthetic biology approach was explored, starting with computational prediction of potential enzyme reactions according to methods described in references 3-6. Sialic acid aldolase was selected to produce 3-fluoro-sialic acid (**6**) from fluoropyruvate and *N*-acetylmannosamine (Figure 3).

初めに、合成生物学的手法として、文献 3-6 を参考にコンピューター解析を用いて利用可能な酵素反応を探索した。その結果、フルオロピルビン酸と *N*-アセチルマンノサミンから 3-フルオロシアル酸(**6**)を合成するシアル酸アルドラーゼを選択した(図 3)。

For the production of **7**, to improve the protection process by preventing lactonization, a sialic acid *O*-acetyltransferase was predicted and selected.

先の *O*-アセチル化におけるラクトン化を抑える酵素反応を探索した結果、シアル酸 *O*-アセチル転位酵素が見つかった。

To achieve C-1 and C-2 fluorine additions, new open-chain analogues were explored (Figure 4). C-1 および C-2 位をフッ素化するため、新たに開環型アナログの検討を行った(図 4)。

### 4. 研究成果

*In vitro* produced **6** could not be directly decarboxylated to key intermediate **7**, due to unwanted 1,7-lactonization. To prevent lactonization, *O*-acetylation and carboxy methyl esterification was followed by selective deprotection of the methyl ester. Then, microwave-assisted decarboxylation could produce **7**. Addition of thiobenzoic acid (SBz) to **7** is being tested.

しかしながら、*in vitro* で調製した **6** からは 1,7-ラクトン化が優先し、鍵となる **7** への脱炭酸は起こらなかった。ラクトン化を抑えるために、*O*-アセチル化とカルボキシ基のメチルエステル化、続くメチルエステルの選択的加水分解を行った。さらに電磁波照射下で脱炭酸を進行させ、**7** を得た。**7** に対しては、チオ安息香酸 (SBz) の付加を行うことが可能である。

A microbial system for 3-fluoro-7-*O*-acetylsialic acid production was prepared by cloning sialic acid aldolase and the *O*-acetyltransferase into compatible bacterial expression vectors. Machine learning prediction of keto acid decarboxylases identified four additional enzyme sequences to be tested for *in vivo* and *in vitro* decarboxylation of sialic acid (Reference 4).

そこで、3-フルオロ-7-*O*-アセチルシアル酸を生産する微生物系を、シアル酸アルドラーゼとこの *O*-アセチル転位酵素を適合する細菌発現ベクターにクローニングすることにより調製した。ケト酸脱炭酸酵素の機械学習予測を行い、*in vivo* および *in vitro* 系でのシアル酸脱炭酸系確立のため、新たに 4 つの酵素系列を特定した(文献 4)。

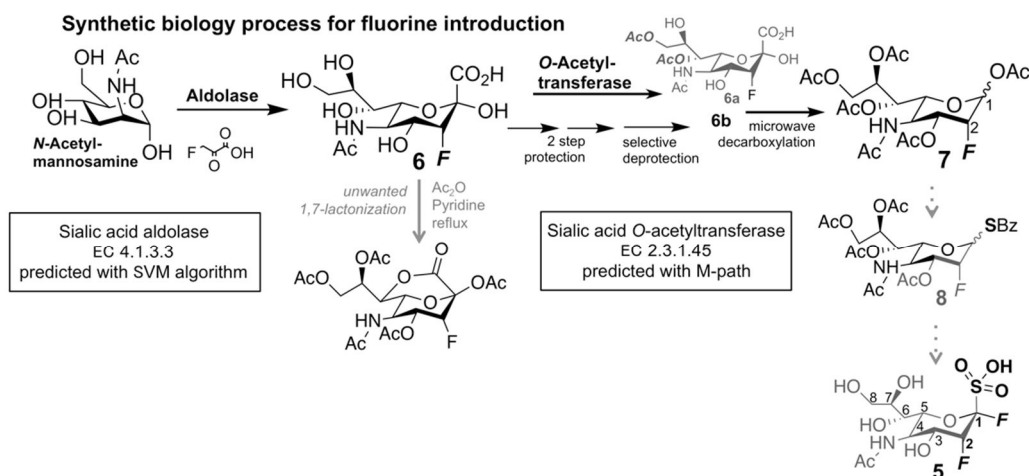
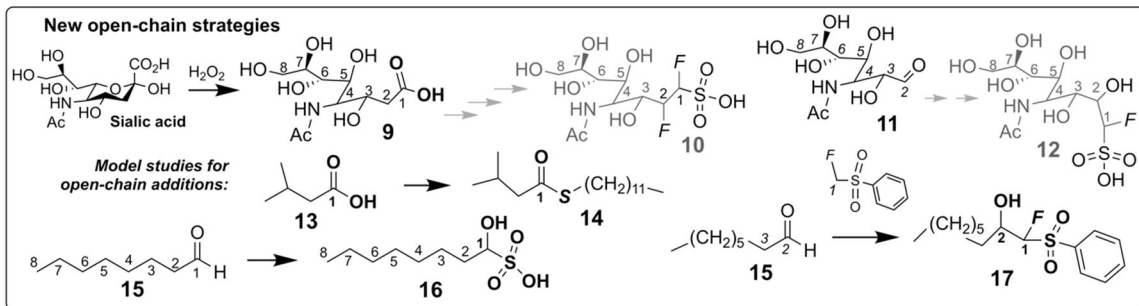


Figure 3 Development of two enzymes for introduction of fluorine at position C-2.

## C-2 位へのフッ素基導入のための2種の酵素の開発

The 8-carbon aldonic acid **9** is produced at over 90% yield from sialic acid. Carboxy to thioester conversion was confirmed with isovaleric acid in a model reaction. Addition of sulfite to octanal results in the 8 carbon sulfonic acid with a C-1 hydroxy group. Addition of fluoromethyl phenyl sulfone to aldehyde **15** results in a model sulfone with C-1 fluorine and C-2 hydroxy groups. The introduced hydroxy groups may be accessible for fluorine substitution.

シアル酸から8-炭素のアルドン酸**9**を>90%収率で合成した。ここで、イソ吉草酸をモデル化合物に、カルボン酸のチオールエステルへの変換が進行することを確認した。スルホ基のオクタナルへの付加により8-炭素でC-1位にヒドロキシ基を持つスルホン酸が合成できた。フルオロメチル=フェニル=スルホンのアルデヒド**15**への付加では、C-1-フルオロ-C-2-ヒドロキシスルホンのモデル化合物を調製した。ここで導入したヒドロキシ基はフルオロ基に置換可能である。



**Figure 4 Introduction of C-1 hydroxy, C-1 fluorine, and C-2 hydroxy into model open-chain analogues.** C-1-ヒドロキシ、C-1-フルオロ、C-2-ヒドロキシ基をもつモデル化合物の合成

The selected *O*-acetyltransferase can also acetylate the sialic acid terminal oxygen, which is useful to produce potential coronavirus fusion inhibitors. Binding of 8-*O*-acetylated sulfonamide **20b** (Figure 5) to a coronavirus sialic acid binding site is shown in Figure 5B.

ここで選択した *O*-アセチル転位酵素を用いれば、シアル酸末端のヒドロキシ基のアセチル化も可能であり、これにはコロナウィルス融合阻害剤への応用が期待される。8-*O*-アセチルスルホンアミド **20b** (図5) とコロナウィルスのシアル酸結合部位との結合様式を図5Bに示す。

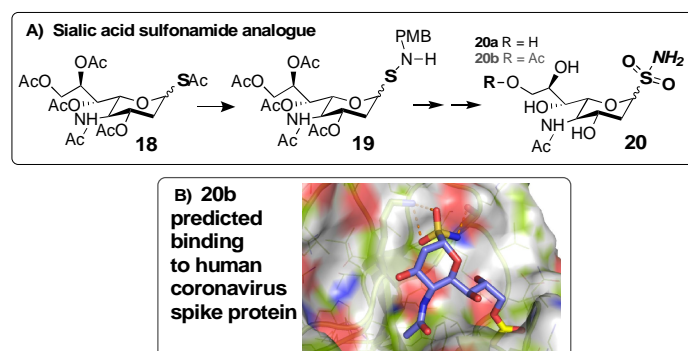


Figure 5 First sialic acid sulfonamide analogue, with synthesis assisted by the laboratory of Hiromasa Kiyota at Okayama University (A), and with potential affinity for coronavirus spike proteins (B). 世界初のシアル酸スルホンアミドアナログ(岡山大学清田洋正研究室にて合成) (A)、およびコロナウィルススパイクタンパク質との結合予測

## References

- 1) ヴァヴリッカ クリストファー J.、松本 達磨、清田 洋正. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 32 : J1–J5 (2020).
- 2) ヴァヴリッカ クリストファー、松本 達磨、荒木 通啓、蓮沼 誠久、泉 実、清田 洋正. 第 61 回天然有機化合物討論会講演要旨集, P2-30 (2019).
- 3) Vavricka, C.J. *et al.* *Nature Communications* 10 : 2015 (2019).
- 4) Vavricka, C.J. *et al.* *Nature Chemical Biology* Under review with preprint DOI: 10.21203/rs.3.rs-184114/v1 (2021).
- 5) Vavricka, C.J., Hasunuma, T., Kondo, A.: *Trends in Biotechnology* 38 : 68-82 (2020).
- 6) Hasunuma, T., Takaki, A., Matsuda, M., Kato, Y., Vavricka, C.J., Kondo, A.: *ACS Synthetic Biology* 8 : 2701-2709 (2019).
- 7) Vavricka, C.J., Muto, C., Hasunuma, T., Kimura, Y., Araki, M., Wu, Y., Gao, G.F., Ohrui, H., Izumi, M., Kiyota, H. Synthesis of sulfo-sialic acid analogues: potent neuraminidase inhibitors in regards to anomeric functionality, *Scientific Reports*, 7 : 8239 (2017).
- 8) Vavricka, C.J., Kiyota, H. シアル酸誘導体、その製造方法及びそれを利用したシアリダーゼ阻害剤、抗菌剤、抗ウイルス剤 (Sialic acid derivatives, production methods, sialidase inhibition, antibacterial and antiviral activity) Japanese Patent Application 2016-162979 (2016).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Christopher J. Vavricka, Tatsuma Matsumoto, Hiromasa Kiyota	4. 巻 32
2. 論文標題 Towards Improvement of Covalent Neuraminidase Inhibitors with Anomeric Substitution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E1-E5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.1801.1E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomohisa Hasunuma, Ayako Takaki, Mami Matsuda, Yuichi Kato, Christopher J. Vavricka, Akihiko Kondo	4. 巻 8
2. 論文標題 Single-Stage Astaxanthin Production Enhances the Nonmevalonate Pathway and Photosynthetic Central Metabolism in <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 2701-2709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.9b00280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Christopher J. Vavricka, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo	4. 巻 38
2. 論文標題 Dynamic Metabolomics for Engineering Biology: Accelerating Learning Cycles for Bioproduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Biotechnology	6. 最初と最後の頁 68-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tibtech.2019.07.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Christopher J. Vavricka, Takanobu Yoshida, Yuki Kuriya, Shunsuke Takahashi, Teppei Ogawa, Fumie Ono, Kazuko Agari, Hiromasa Kiyota, Jianyong Li, Jun Ishii, Kenji Tsuge, Hiromichi Minami, Michihiro Araki, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo	4. 巻 10
2. 論文標題 Mechanism-based tuning of insect 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde synthase for synthetic bioproduction of benzylisoquinoline alkaloids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-09610-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Christopher J. Vavricka, Tatsuma Matsumoto, Hiromasa Kiyota	4. 巻 32
2. 論文標題 Towards improvement of covalent NA inhibitors with anomeric substitution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E1-E5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1801.1E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Christopher J. Vavricka, Takanobu Yoshida, Yuki Kuriya, Shunsuke Takahashi, Teppei Ogawa, Fumie Ono, Kazuko Agari, Hiromasa Kiyota, Jianyong Li, Jun Ishii, Kenji Tsuge, Hiromichi Minami, Michihiro Araki, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo	4. 巻 10
2. 論文標題 Mechanism-based tuning of insect 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde synthase for synthetic bioproduction of benzylisoquinoline alkaloids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09610-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 VAVRICKA, CHRISTOPHER JOHN
2. 発表標題 Genome-scale prediction of gene ontology from yeast knockout MASS fingerprints
3. 学会等名 Frontiers in Genome Engineering 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 VAVRICKA, CHRISTOPHER JOHN, 清田洋正, 荒木通啓, 近藤昭彦, 蓮沼誠久
2. 発表標題 Application of the design, build, test and learn paradigm to the discovery and engineering of specialized aromatic aldehyde synthases
3. 学会等名 The 37th Symposium on Environmental Science of Pesticide
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 VAVRICKA, CHRISTOPHER JOHN, 松本 達磨, 荒木 通啓, 蓮沼 誠久, 泉 実, 清田 洋正
2. 発表標題 Re-design, synthesis, and bio-analysis of sulfosialic acids as covalent inhibitors of neuraminidase
3. 学会等名 第61回天然有機化合物討論会 2019年9月
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本達磨、武藤千明、森さおり、Christopher J. Vavricka、蓮沼誠久、泉実、清田洋正
2. 発表標題 シアル酸 1 位置換誘導体の合成研究
3. 学会等名 農芸化学会中四国支部大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	清田 洋正  (Kiyota Hiromasa)  (30234397)	岡山大学・環境生命科学研究科・教授    (15301)	

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
---------	---------