

博士論文

抗ノロウイルス活性を有する低分子化合物の探索

Screening and structural optimization  
for small molecule anti-norovirus agents

2016年3月

March 2016

静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府

薬科学専攻 博士後期課程

創薬探索センター

大場 舞

Mai Ohba

博士論文

抗ノロウイルス活性を有する低分子化合物の探索

Screening and structural optimization  
for small molecule anti-norovirus agents

本論文は静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士論文である

2016年3月

March 2016

静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府

薬科学専攻 博士後期課程

創薬探索センター

大場 舞

Mai Ohba

# 目次

序論	1
本論	
第 1 章 抗ノロウイルス活性を有する化合物の探索	
第 1 節 評価対象化合物の選抜	6
第 2 節 スクリーニング系の構築と抗ノロウイルス化合物の探索	6
第 3 節 小括	9
第 2 章 複素環カルボキサミド類縁体の構造活性相関と作用メカニズムの解析	
第 1 節 複素環カルボキサミド類縁体の合成と活性評価	10
第 1 項 6-フルオロベンズチアゾールアナログの合成と活性評価	11
第 2 項 5-ブロモチオフェンアナログの合成と活性評価	13
第 3 項 ハイブリッド化合物の合成と活性評価	14
第 2 節 複素環カルボキサミド類縁体の作用メカニズムの解析	15
第 1 項 遠心式フィルターを用いた TCID <sub>50</sub> アッセイ	15
第 2 項 Time-of-addition アッセイ	16
第 3 項 プロテアーゼ活性阻害の検討 ( <i>In vitro</i> transcription/translation アッセイ)	17
第 3 節 小括	18
第 3 章 テアフラビン類の活性評価と作用メカニズムの解析	
第 1 節 テアフラビン類の活性評価と作用メカニズムの解析	19
第 1 項 遠心式フィルターを用いた TCID <sub>50</sub> アッセイ	19
第 2 項 ポリフェノール類の活性評価	20
第 3 項 テアフラビン類の活性評価	22
第 4 項 テアフラビン類の濃度および感作時間の検討	24
第 5 項 pH の変化による活性への影響	26
第 6 項 共存タンパクの活性への影響	27
第 7 項 リアルタイム PCR によるウイルス RNA 量の評価	28
第 8 項 アセチル化によるテアフラビン類の化学修飾	29
第 9 項 テアフラビン類の細胞毒性評価	29
第 2 節 小括	31
総括	32
謝辞	34

実験の部	35
引用文献	54

## 略語

Ac: acetyl  
ATCC : American type culture collection  
CC<sub>50</sub>: 50% cytotoxic concentration  
3CLpro: 3C-Like protease  
2'-CMC: 2'-C-methylcytidine  
CPE: cytopathic effect  
CRFK: crandell-reese feline kidney  
DMAP: 4-dimethylaminopyridine  
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium  
DMSO: dimethyl sulfoxide  
DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline  
EC<sub>50</sub>: 50% effective concentration  
EDC·HCl: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride  
ESIMS: electrospray ionization mass spectrometry  
FBS: fetal bovine serum  
FCV: feline calicivirus  
GABA:  $\gamma$ -aminobutyric acid  
HEPES: *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid  
hNoV: human norovirus  
MEM: minimum essential medium  
MeOH: methanol  
MNV: murine norovirus  
MOI: multiplicity of infection  
ORF: open reading frame  
PCR: polymerase chain reaction  
PoSaV: porcine sapovirus  
PVDF: polyvinylidene difluoride  
RdRp: RNA dependent RNA polymerase  
RI: radioisotope  
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis  
TCID<sub>50</sub>: 50% tissue culture infectious dose  
TFA: trifluoroacetic acid  
TF1: theaflavin  
TF2A: theaflavin-3-*O*-gallate  
TF2B: theaflavin-3'-*O*-gallate

TF3: theaflavin-3,3'-*O,O*-digallate

VLP: virus-like particle

VP: viral protein

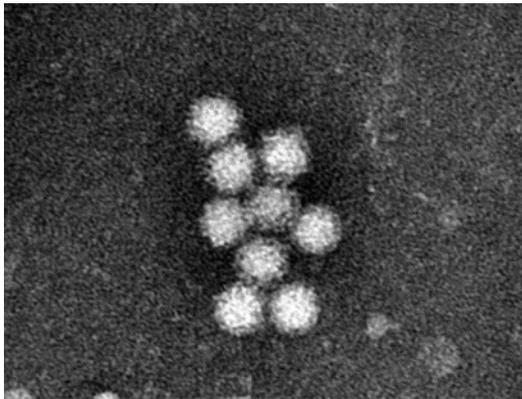
VPg: viral protein genome

WST-8: water-soluble tetrazolium salt-8

## 序論

### ノロウイルス感染症

ノロウイルス (Figure 1) は、食中毒および感染症による急性ウイルス性胃腸炎の主要な病原体である<sup>1)</sup>。発熱、下痢、嘔吐、悪心等の症状は、健常人であれば数日で寛解するが、乳幼児や高齢者、免疫不全患者等では重症化し、死に至ることもある。患者便および嘔吐物からはウイルス粒子が大量に検出され (便 1 g 中に  $10^4$ – $10^8$  個)、それらから 2 次感染を起こすことが知られており、世界では年間約 20 万人の乳幼児が亡くなっている<sup>2)</sup>。ノロウイルス対策は公衆衛生対策上重要な課題の一つとなっており、感染症および食中毒予防のため、病原体の殺菌・消毒法の確立が必須となる。ノロウイルスの不活化に有効な方法としては、85–90 °C、90 秒以上の加熱処理もしくは次亜塩素酸ナトリウムの使用が推奨されているが<sup>3)</sup>、加熱による熱変性、次亜塩素酸ナトリウムによる漂白作用や刺激、金属の腐食等により使用できる機会が制限されている。そのため、安心・安全で用途の広い有効な殺菌・消毒法の開発が求められている<sup>4)</sup>。また、数個のウイルス粒子で感染が成立するため、病院や幼稚園、学校、高齢者施設等では、爆発的に感染が広がる場合がある<sup>5)</sup>。ウイルスの排泄は熱が下がってから 3–7 日間継続するとされ、特に感染リスクの高い人々が集まる上記の施設においては、ノロウイルス治療・予防薬に関するニーズも高い。



**Figure 1.** Morphology of the human pathogenic norovirus examined by transmission electron microscopy.

### ノロウイルスの遺伝子構造

ノロウイルスはエンベロープを持たない、一本鎖 (+)RNA をゲノムとして持つ小型ウイルスで、カリシウイルス科 (*Caliciviridae*) ノロウイルス属 (*Genus Norovirus*) に含まれるウイルスの総称である。ウイルスゲノムには ORF1, ORF2, ORF3 の 3 つの読み取り枠 (Open reading frame) が存在する。ORF1 はウイルスの増殖に必要な 6–7 種類の非構造タンパク質、すなわち RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA dependent RNA polymerase (RdRp): NS7) や 3C 様プロテアーゼ (3C-like protease (3CLpro): NS6) 等をコードしている。ORF2 は主要なウイルス構造タンパク質である VP (viral protein) 1 を、ORF3 はマイナーな構造タンパク質である

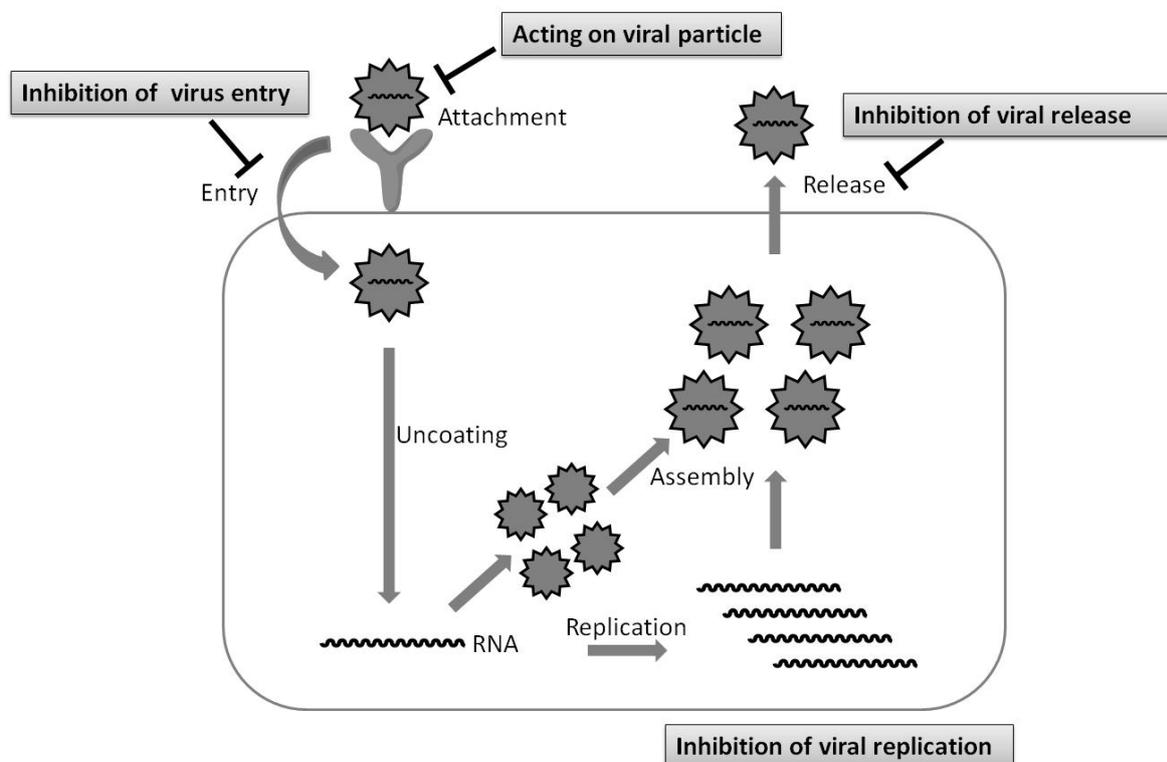


の培養は、ブタ腎近位尿細管上皮由来細胞である LLC-PK 細胞 (ATCC cat. code; CL-101) で可能である<sup>16, 17)</sup>。上述した 3 つのヒトノロウイルス代替ウイルスを比較すると、FCV は pH 感受性が高いが、アルコール感受性は低く、PoSaV は熱に対する耐性が比較的高いという特徴がある<sup>18)</sup>。

### 抗ノロウイルス薬開発の現状

抗ノロウイルス薬ターゲットとしては、大きく分けて次の 4 点が考えられる (Figure 3)<sup>7)</sup>。

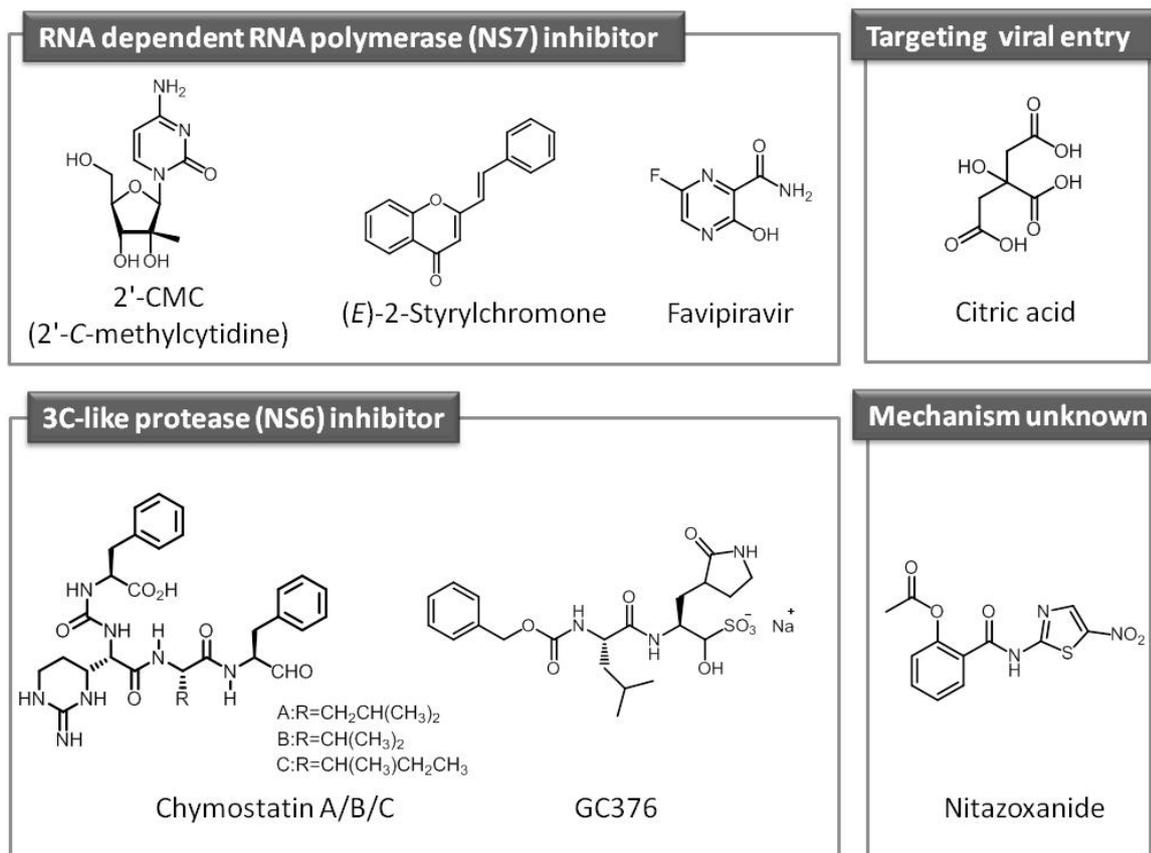
- 1) ウイルス粒子 (直接作用によるウイルスの不活化)
- 2) ウイルスの宿主細胞への接着、侵入過程
- 3) 宿主細胞内でのウイルス複製過程
- 4) 増殖したウイルスの宿主細胞外放出過程



**Figure 3.** Norovirus life cycle and potential intervention sites.

抗ノロウイルス薬としては、これまでに種々の報告がある。例えば天然物では、柿抽出物について抗 FCV および MNV 作用やヒトノロウイルス患者検体由来のウイルス遺伝子を減少させることが報告されている<sup>19-21)</sup>。その他ブドウの種子抽出物 (メカニズム不明)<sup>22)</sup> や赤ワイン (詳細は不明だが、感染の初期段階を阻害)<sup>23)</sup> などポリフェノールを多く含む食品や、ラクトフェリン (宿主細胞やウイルスに接着し細胞へのウイルス侵入を阻害・インターフェロン- $\alpha/\beta$  産生促進によるウイルス複製阻害)<sup>24)</sup>、クエン酸 (宿主細胞へのウイルス侵入阻害)<sup>25)</sup> など食品由来の天然物についても報告例がある。また、合成低分子化合物について

も種々の報告がある<sup>7, 26)</sup>。前述の非構造タンパク質である 3CLpro 阻害作用が報告されている dipeptidyl aldehyde GC376<sup>27)</sup>、chymostatin<sup>28)</sup>、RdRp 阻害作用のある 2'-C-methylcytidine (2'-CMC)<sup>29, 30)</sup>、favipiravir<sup>31)</sup>、(E)-2-styrylchromone<sup>32)</sup> 等である。また、抗原虫薬として上市されている nitazoxanide<sup>7, 33)</sup> は、インフルエンザウイルスや B 型および C 型肝炎ウイルスなど広域スペクトルをもつ抗ウイルス薬であり、米国でノロウイルスによって引き起こされる胃腸炎を対象として臨床第 II 相試験に進んでいる。ただし、ノロウイルスに対する詳細なメカニズムは明らかにされていない (Figure 4)。



**Figure 4.** The known antivirals for norovirus.

ワクチンの開発も進んでおり、その多くは VLP (virus-like particle: ウイルス様粒子) を免疫抗原として利用したものである。VLP とは、内部にウイルスゲノムを持たない外殻のみで構成される粒子で、宿主内での増殖はできないが外殻に対する抗体産生を誘導する。ヒトノロウイルス GI/GII の 2 価ワクチンの臨床第 I/II 相試験において、服用したヒトノロウイルスに起因する嘔吐や下痢の発症者を減少させたが、まだ実用化には至っていない<sup>2)</sup>。

上述の通り、抗ノロウイルス薬の基礎研究は盛んに行われているが、治療・予防薬として上市され、医療現場で使用されているものはない。また、手指等にも使用可能な抗ノロウイルス効果のある殺菌・消毒薬として厚生労働省に認められているものも未だなく、石けんで十分に手を洗うことが唯一の予防手段である。2014/15 シーズンには、外殻部分のアミノ酸変異および RdRp 領域の新規遺伝子型を示す GII.P17-GII.17 が発見された。これまで主流で

あった遺伝子型 GII.4 に代わり、新たなウイルスによる爆発的な感染の流行が懸念されている<sup>34)</sup>。したがって、ノロウイルスの治療・予防薬および安全で効果の高い殺菌・消毒薬の開発が強く望まれている。そこで、新たな抗ノロウイルス化合物の探索を目的として、ノロウイルス代替ウイルスを用いたスクリーニング系を構築し、ヒット化合物の構造活性相関研究および作用メカニズムの解析を行った。本研究によって見出された2種類の化合物は、ノロウイルス治療薬・予防薬のリード化合物、または広域スペクトルを有する殺菌・消毒薬の有効成分として活用が期待される。

# 本論

## 第 1 章 抗ノロウイルス活性を有する化合物の探索

### 第 1 節 評価対象化合物の選抜

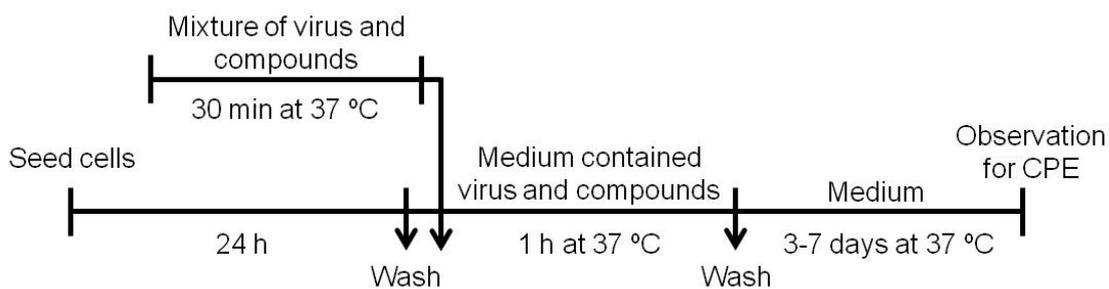
抗ノロウイルス活性を有する化合物を効率的に見出すため、まず、2080 化合物を in-house ライブラリーから選抜した (Table 1)。その具体的な選抜基準として、柿抽出物やブドウ種子などの天然物について抗ノロウイルス効果の報告が多くなされていること、他のウイルスに対する阻害薬についてノロウイルスへの適応拡大の報告があることから、天然物や抗ウイルス薬とそれに近い構造を持つものを中心に選抜した。アルキル化薬は、DNA をアルキル化することで細胞増殖抑制効果を示すが、同様の機序でウイルス RNA をアルキル化し、ウイルスを不活化することを予想して選抜した。界面活性剤はノロウイルスのような非エンベロープ型のウイルスには効きにくいとされているが<sup>35)</sup>、その効果を再検証するために用いた。合成低分子化合物には、in-house 合成したものや市販化合物ライブラリーの中から構造的多様性を主眼にして選択した。また、最近注目されているドラッグ・リポジショニングの観点から、臨床薬など活性既知の化合物も選抜した。

**Table 1.** Classification of screening compounds.

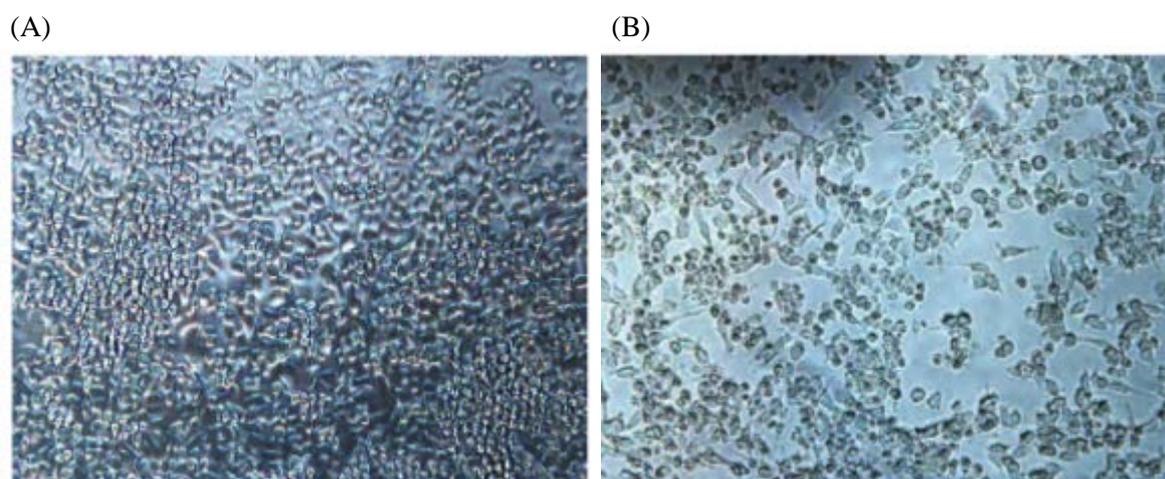
天然物ライブラリー	771
抗ウイルス薬と構造類縁体	312
アルキル化薬と構造類縁体	29
界面活性剤	30
合成低分子化合物	784
生理活性化合物	154
	<hr/>
	2080

### 第 2 節 スクリーニング系の構築と抗ノロウイルス化合物の探索

抗ノロウイルス化合物の探索にあたり、まずは作用機序を限定せず、ウイルス接種による CPE (cytopathic effect: 細胞変性効果) を抑制する化合物を探索するスクリーニング系を構築した。また、より広いスペクトルをもつ化合物を得るために、序論で述べた 3 種のヒトノロウイルス代替ウイルス (MNV S-7 株、FCV 2280 株、PoSaV cowden 株) を用いた。具体的な評価系としては、化合物溶液 (終濃度 25  $\mu$ M) とウイルス液 (100 TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infectious dose) /50  $\mu$ L) を等量混合した後、37  $^{\circ}$ C のインキュベーター内で静置し、30 分後、混合液を 96 穴プレートに播種した細胞に接種した。化合物の細胞への影響を避けるため、1 時間後、細胞上清をデカントし、培地に置き換えた。判定までに要する時間はウイルスにより異なるが、3 日から 7 日後にウイルスによって引き起こされる CPE を顕微鏡で観察し、CPE が見られなかったウェルの化合物をヒット化合物とした (Figure 5, 6)。



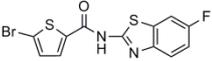
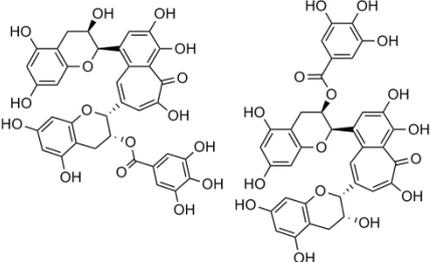
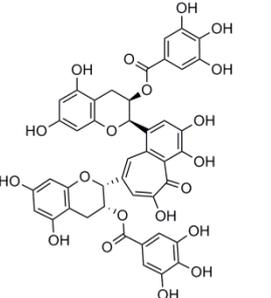
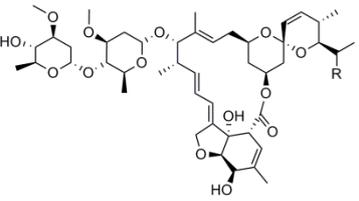
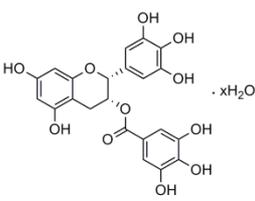
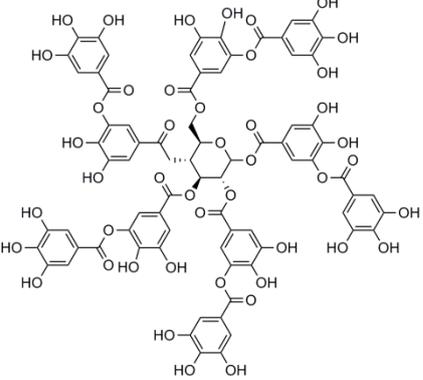
**Figure 5.** Protocol for cell-based screening system.



**Figure 6.** RAW264.7 cell. (A) CPE (-) (B) CPE (+)

上述したプロトコールで化合物を数回評価し、再現性良好な化合物として、ウイルス特異的に CPE を阻止するもの、3種のウイルス全てに対して CPE を阻止するもの合わせて 7 種をヒット化合物として同定した。さらにヒット化合物について、ウイルス感作時の終濃度が  $100-6.3 \mu\text{M}$  となるように 2 倍段階希釈列を作製し、スクリーニングと同様の操作を行うことによって最小有効濃度 (CPE を阻止した、化合物の最小濃度) を算出した (Table 2)。CPE の有無は、スクリーニングと同様に目視で判定した。

**Table 2.** Structures and antiviral activity of hit compounds.

Compound	Minimal effective concentration ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>		
	MNV	FCV	PoSav
 <b>1</b>	25	>100	>100
 Theaflavin monogallates (mixture)	50	100	50
 Theaflavin digallate	50	25	25
 Abamectin (avermectin B1a & B1b) Avermectin B1a R = CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (Avermectin B1a) R = CH <sub>3</sub> (Avermectin B1b)	>100	>100	12.5
 (-)-Epigallocatechin gallate hydrate	>100	>100	25
 Tannic acid	>100	>100	25

a) Results from two independent experiments and data are expressed as the mean.

合成低分子化合物ライブラリー由来の **1** が MNV 特異的に CPE を阻止した。天然物ライブラリーからは、アバメクチン (アベルメクチン B1a および B1b の混合物) およびアベルメクチン B1a、(-)-エピガロカテキンガレート水和物、タンニン酸が PoSaV 特異的な CPE 阻止作用を示した<sup>36)</sup>。さらに同じ天然物ライブラリー由来であるテアフラビン類が 3 種のウイルスすべてに抗ウイルス活性を示した。アバメクチンは、マクロサイクリックラクトン系の殺虫剤であり、GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) アゴニストとしてシナプス末端に存在するシナプス前膜からの GABA の放出を促す。その結果、細胞内への Cl<sup>-</sup> イオンの取り込みが促進し、神経シグナルが阻害されることで幅広い殺虫、殺ダニ、殺線虫活性を示すことが知られている<sup>37-40)</sup>。(-)-エピガロカテキンガレートは緑茶カテキンの一種であり、抗酸化作用、抗菌作用、抗肥満作用および抗アレルギー作用など多くの生理活性が報告されている<sup>41-44)</sup>。また、タンニン酸は先述の柿抽出物中の主成分である<sup>21)</sup>。

### 第 3 節 小括

In-house ライブラリーから選抜した 2080 化合物を対象に、ヒトノロウイルス代替ウイルスとして MNV, FCV, PoSaV の 3 種のウイルスを用いたスクリーニングを行った。その結果、ウイルス感染による CPE を阻止した 7 種の化合物をヒット化合物として同定した。そのうち、MNV 特異的な化合物 **1** は合成展開が容易であること、また、ヒトノロウイルスと同じノロウイルス属で唯一培養可能な MNV に活性を示したことから、ヒトノロウイルスへの適用の可能性が高いことを考慮し、**1** の構造活性相関と抗ウイルスメカニズムの検討を行うこととした。この詳細を第 2 章で述べる。また、3 種の代替ウイルスすべてに抗ウイルス活性を示したテアフラビン類について、活性評価と抗ウイルスメカニズムに関する検討を行うこととした。この詳細を第 3 章で述べる。

## 第 2 章 複素環カルボキサミド類縁体の構造活性相関と作用メカニズムの解析

スクリーニングにおいて見出された化合物 **1** は、3 種の代替ウイルスのうち MNV のみに抗ウイルス活性を示した。序論で述べた通り、ノロウイルス代替ウイルスを用いた実験では、複数の代替ウイルスを使用することが望ましいとされている。しかし、MNV が人工培養可能な代替ウイルスの中でヒトノロウイルスに最も近縁なウイルスであることや、**1** が新規性を有する化合物であること、合成展開によってさらなる活性の向上が期待できることから、構造活性相関研究と作用メカニズムの解析を試みることにした。化合物 **1** は、5-ブロモチオフェン環と 6-フルオロベンゾチアゾール環がアミド結合で連結された低分子複素環カルボキサミド化合物である (Figure 7)。一方、5-ブロモチオフェン環をベンゼン環に置き換えた構造を有する **1a** および **1b**、5-ブロモチオフェン環とアミドのカルボニルの間にリンカーを有する **1c** は不活性であった。そこで著者は、チオフェン-ベンゾチアゾールカルボキサミド構造が抗ウイルス活性の鍵骨格となると考え、さらに高活性な化合物を創出するため、**1** の誘導体合成に着手した。

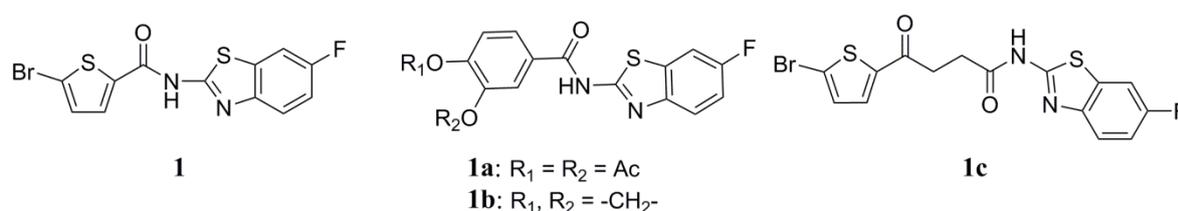
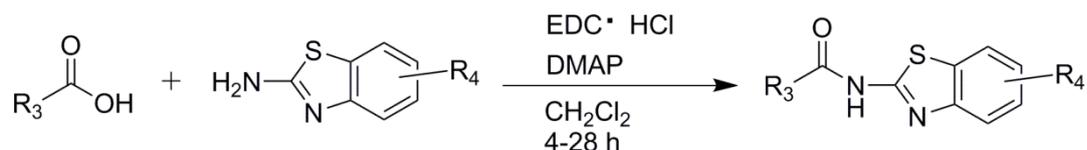


Figure 7. Structures of hit compound **1** and inactive analogs **1a**, **1b** and **1c**.

### 第 1 節 複素環カルボキサミド類縁体の合成と活性評価

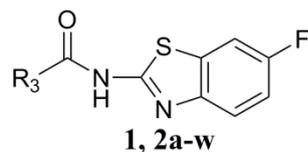
類縁体合成は **1** を基本の構造として、5-ブロモチオフェン環と 6-フルオロベンゾチアゾール環をそれぞれ固定し、もう一方の環について、環および置換基を変換して構造活性相関を得ることとした。2 つの複素環間のアミド結合形成には、カップリング試薬である 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC·HCl) と 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) を用い、室温下の緩和な条件下で合成した (Scheme 1)。誘導体の抗ウイルス活性の評価は、MNV を用いた CPE reduction アッセイにより行った。手順はスクリーニングと同様に、ウイルス力価は 280 TCID<sub>50</sub>/50 μL で評価した。誘導体の 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) と 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) を Table 3-5 に記載した。CC<sub>50</sub> 値は、化合物と細胞の接触時間を 2 点 (1 時間および 72 時間) 評価した。陽性対照としては、RdRp 阻害薬である 2'-CMC を用い、利用した評価系で抗 MNV 活性を示すことを確認した。



Scheme 1. Synthesis of heterocyclic carboxamide derivatives. R<sub>3</sub>: Tables 3 and 5. R<sub>4</sub>: Tables 4 and 5.

## 第 1 項 6-フルオロベンゾチアゾールアナログの合成と活性評価

まず、6-フルオロベンゾチアゾール環を固定してチオフェン部の置換基変換および環変換によって類縁体 **2a-w** を合成し、活性を比較した (Table 3)。チオフェン環上の置換基を有さない類縁体 **2a** には抗ウイルス活性がみられなかったため、**1** のチオフェン環上のプロモ基が活性に不可欠であると考えられた。また、チオフェン環の 5 位にクロロ基を有する **2b** と 5-プロモ体 **1** の活性は同程度であった (**2b**,  $EC_{50} = 30 \mu\text{M}$ ; **1**,  $EC_{50} = 37 \mu\text{M}$ )。さらに、一置換体の  $EC_{50}$  値は  $30 \mu\text{M}$  以上であるのに対し、二置換体である 3,5-ジクロロチオフェンアナログ **2k** は  $EC_{50}$  値が  $6.6 \mu\text{M}$  と高い活性を示した。3,5-ジブロミド **2j** や 4,5-ジクロリド **2m** においても、大きな活性の向上はみられなかったものの、一置換体よりもやや高い活性を示した。その他、5-フルオロ体、5-*t*-ブチル体、4-または 3-一置換ハロゲン体、4,5-ジプロモ体および 3,4,5-トリクロロ体 (**2c-i**, **l**, **n**) には顕著な活性はみられなかった。さらに、チオフェン以外の複素環 (フラン環 **2o-q**; チアゾール環 **2r**; ベンゾチオフェン環 **2s**) や、チオフェンのアミド結合位置の変更を試みたが (**2t-w**)、活性は向上しなかった。1 時間における  $CC_{50}$  値については、ほとんどの化合物が評価した最高濃度である  $100 \mu\text{M}$  で細胞毒性を示さなかったが、72 時間では、**2m** で  $EC_{50}$  値と同程度 ( $EC_{50} = 24 \mu\text{M}$ ,  $CC_{50} = 22 \mu\text{M}$ )、**2j** で  $EC_{50}$  値よりも低濃度 ( $EC_{50} = 24 \mu\text{M}$ ,  $CC_{50} = 7.9 \mu\text{M}$ ) で細胞毒性がみられた。これらの結果から、環としてはチオフェンが適しており、さらにその結合位置は 2 位が妥当であること、3 位と 5 位にクロロ基を有する構造で最も高い活性が得られることがわかった。また、一部の化合物に細胞毒性が懸念されるため、活性と細胞毒性の解離が必要であることがわかった。

**Table 3.** Antiviral activity and cytotoxicity of 6-fluoro-benzothiazole analogs.

Compound	R <sub>3</sub>	Substituent	Position of linkage	EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	
					1 h	72 h
2'-CMC				56	>100	12
<b>1</b>	Thiophene	5-Br	2	37	>100	>100
<b>2a</b>	Thiophene	None	2	>100	>100	>100
<b>2b</b>	Thiophene	5-Cl	2	30	>100	>100
<b>2c</b>	Thiophene	5-F	2	>100	75	1.9
<b>2d</b>	Thiophene	5- <i>t</i> -Bu	2	>100	>100	>100
<b>2e</b>	Thiophene	4-Cl	2	>100	>100	52
<b>2f</b>	Thiophene	4-Br	2	>100	>100	>100
<b>2g</b>	Thiophene	3-F	2	>100	>100	>100
<b>2h</b>	Thiophene	3-Cl	2	>100	>100	65
<b>2i</b>	Thiophene	3-Br	2	>100	>100	77
<b>2j</b>	Thiophene	3,5-Br	2	24	>100	7.9
<b>2k</b>	Thiophene	3,5-Cl	2	6.6	>100	>100
<b>2l</b>	Thiophene	4,5-Br	2	>100	>100	>100
<b>2m</b>	Thiophene	4,5-Cl	2	24	>100	22
<b>2n</b>	Thiophene	3,4,5-Cl	2	89	>100	>100
<b>2o</b>	Furan	None	2	>100	>100	>100
<b>2p</b>	Furan	5-Cl	2	>100	>100	74
<b>2q</b>	Furan	5-Br	2	>100	>100	>100
<b>2r</b>	Thiazole	None	2	>100	>100	15
<b>2s</b>	Benzothiophene	None	2	65	>100	>100
<b>2t</b>	Thiophene	2-Br	3	>100	>100	>100
<b>2u</b>	Thiophene	4-Br	3	>100	>100	>100
<b>2v</b>	Thiophene	5-Br	3	>100	>100	>100
<b>2w</b>	Thiophene	2,5-Br	3	>100	>100	>100

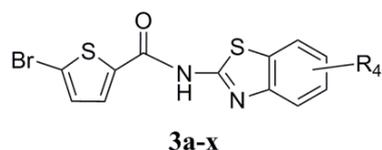
a) EC<sub>50</sub> was evaluated by the CPE reduction assay. 280 TCID<sub>50</sub>/50 μL of MNV and a dilution series of each compound were incubated for 30 min. And the mixture was exposed to RAW264.7 cells for 1 h (in duplicate).

b) Cytotoxicity was evaluated by the water-soluble tetrazolium salt (WST)-8 assay. RAW264.7 cells were treated with dilution series of each compound for 1h (in duplicate) or 72 h (in triplicate).

## 第 2 項 5-ブロモチオフェンアナログの合成と活性評価

次に、**1** の 5-ブロモチオフェン環を固定したまま、ベンゾチアゾール部の置換基効果を検討した (Table 4)。ベンゾチアゾール環上に置換基を有さない類縁体 **3a** には活性がみられないことから、**1** の 6 位フルオロ基が活性の発現に重要であることがわかった。また、6 位にクロロ基を有する **3b** も中程度の活性を示したが ( $EC_{50} = 56 \mu\text{M}$ )、4 位または 5 位置換体である **3d-i** には活性がみられなかった。また、ハロゲン以外のメチル、メトキシ、エトキシ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、エトキシカルボニル、*t*-ブチルを置換した **3n-x** についても、活性は確認できなかった。各種検討の結果、4,6-ジフルオロ体 **3j** が **1** の 6 倍もの高い活性を示し ( $EC_{50} = 5.6 \mu\text{M}$ )、さらに細胞毒性を示さなかった。また、4-ブロモ-6-フルオロ体 **3l** も活性を示した。しかし、二置換ハロゲン体である 4,6-ジクロロ体 **3k** や 5,6-ジフルオロ体 **3m** では活性が確認されなかったことから、4 位と 6 位にフルオロ基を導入することが活性向上に重要であるということが示唆された。

**Table 4.** Antiviral activity and cytotoxicity of 5-bromo-thiophene analogs.



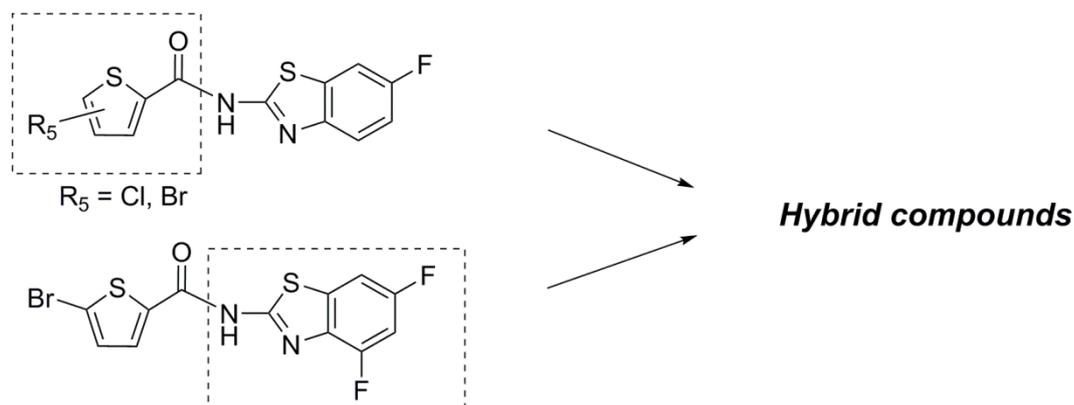
Compound	R <sub>4</sub>	EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>		Compound	R <sub>4</sub>	EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	
			1 h	72 h				1 h	72 h
<b>3a</b>	None	>100	>100	>100	<b>3m</b>	5,6-F	>100	>100	25
<b>3b</b>	6-Cl	56	>100	>100	<b>3n</b>	6-Me	>100	>100	>100
<b>3c</b>	6-Br	>100	>100	>100	<b>3o</b>	4-Me	>100	>100	>100
<b>3d</b>	5-F	>100	>100	>100	<b>3p</b>	5,6-Me	>100	>100	>100
<b>3e</b>	5-Cl	>100	>100	>100	<b>3q</b>	6-OMe	>100	>100	>100
<b>3f</b>	5-Br	>100	>100	>100	<b>3r</b>	4-OMe	>100	>100	>100
<b>3g</b>	4-F	>100	>100	5.1	<b>3s</b>	6-OEt	>100	>100	>100
<b>3h</b>	4-Cl	>100	>100	>100	<b>3t</b>	6-NO <sub>2</sub>	>100	>100	17
<b>3i</b>	4-Br	>100	>100	>100	<b>3u</b>	6-CF <sub>3</sub>	>100	>100	11
<b>3j</b>	4,6-F	5.6	>100	>100	<b>3v</b>	6-OCF <sub>3</sub>	>100	>100	22
<b>3k</b>	4,6-Cl	>100	>100	>100	<b>3w</b>	6-CO <sub>2</sub> Et	>100	>100	>100
<b>3l</b>	4-Br,6-F	20	>100	>100	<b>3x</b>	6- <i>t</i> -Bu	>100	91	6.0

a) EC<sub>50</sub> was evaluated by the CPE reduction assay. 280 TCID<sub>50</sub>/50 μL of MNV and dilution series of each compound were incubated for 30 min. The mixture was exposed to RAW264.7 cells for 1 h (in duplicate).

b) Cytotoxicity was evaluated by the WST-8 assay. RAW264.7 cells were treated with dilution series of each compound for 1h (in duplicate) or 72 h (in triplicate).

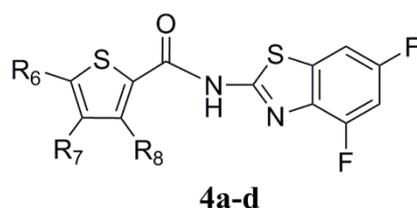
### 第 3 項 ハイブリッド化合物の合成と活性評価

活性の向上を図るため、Table 3 および Table 4 で高活性を示した 5-クロロチオフェン体 **2b**、3,5-または 4,5-ジハロゲン化チオフェン体 **2j, k, m** および 4,6-ジフルオロベンゾチアゾール体 **3j** を用いて、三置換もしくは四置換のハイブリッド化合物 **4a-d** の合成と評価を行った (Scheme 2 および Table 5)。その結果、3,5-ジブロモチオフェン-4,6-ジフルオロベンゾチアゾール体 **4b** が最も高い活性を示すとともに ( $EC_{50} = 0.53 \mu\text{M}$ 、**1** の約 70 倍)、他のハイブリッド化合物 **4a, c, d** についても大幅な活性の向上がみられた ( $EC_{50} = 1.1\text{--}2.1 \mu\text{M}$ )。これらの化合物の  $CC_{50}$  値はすべて  $EC_{50}$  値よりも高く、活性と細胞毒性の解離にも成功した。



**Scheme 2.** Strategy for designing hybrid compounds.

**Table 5.** Antiviral activity and cytotoxicity of *tetra*-halogenated hybrid compounds.



Compound	$R_6$	$R_7$	$R_8$	$EC_{50} (\mu\text{M})^a$	$CC_{50} (\mu\text{M})^b$	
					1 h	72 h
<b>4a</b>	Cl	H	H	2.1	>100	>100
<b>4b</b>	Br	H	Br	0.53	>100	>100
<b>4c</b>	Cl	H	Cl	1.1	>100	>100
<b>4d</b>	Cl	Cl	H	1.4	>100	31

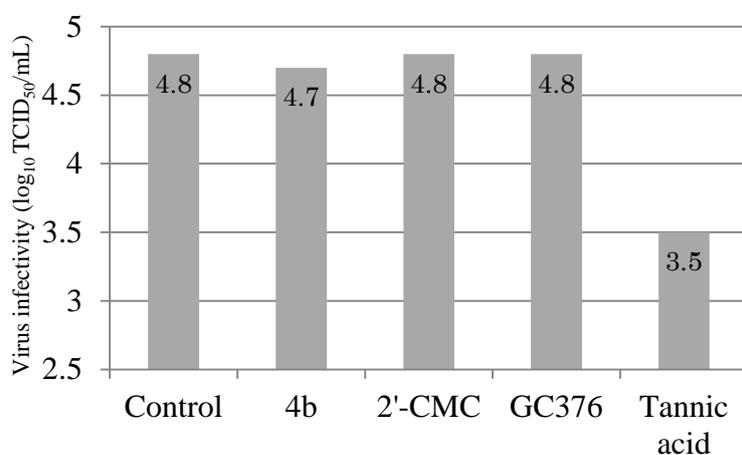
a)  $EC_{50}$  was evaluated by the CPE reduction assay. 280 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu\text{L}$  of MNV and a dilution series of each compound were incubated for 30 min. The mixture was exposed to RAW264.7 cells for 1 h (in duplicate).

b) Cytotoxicity was evaluated by the WST-8 assay. RAW264.7 cells were treated with dilution series of each compound for 1h (in duplicate) or 72 h (in triplicate).

## 第 2 節 複素環カルボキサミド類縁体の作用メカニズムの解析

### 第 1 項 遠心式フィルターを用いた TCID<sub>50</sub> アッセイ

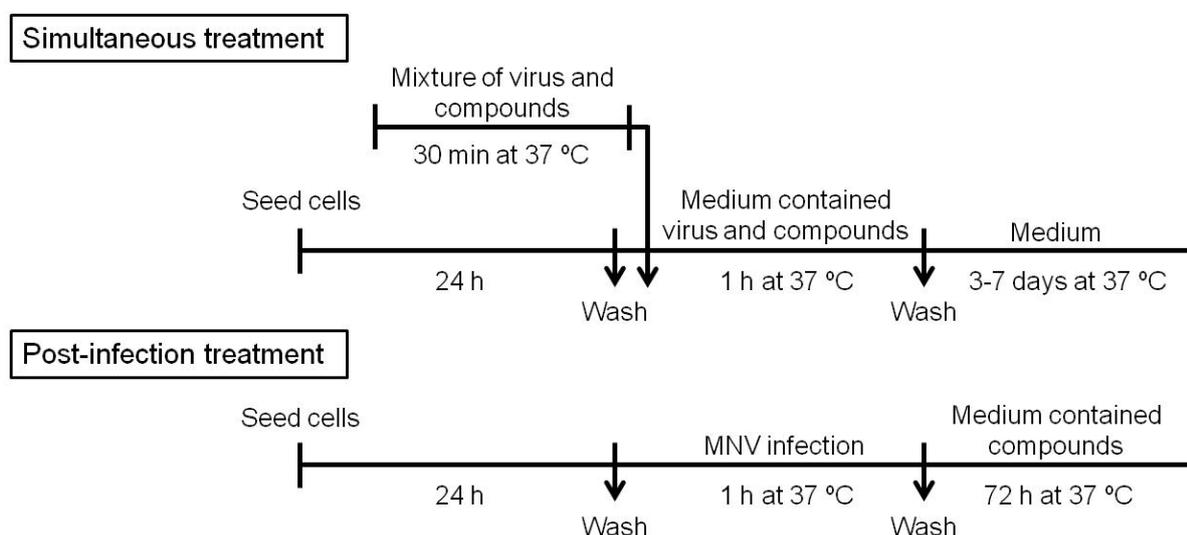
作用メカニズムを解析するため、複素環カルボキサミド誘導体のウイルス粒子への作用を評価した。すなわち、**4b** とウイルス液を混合して室温で 1 時間感作させた後、遠心式フィルターを用いて **4b** を除去し、回収したウイルス液を細胞に接種した。対照として RdRp 阻害薬である 2'-CMC および 3CL pro 阻害薬の GC376 を使用し、ウイルス力価は TCID<sub>50</sub> アッセイにより測定した。また、既報からウイルス粒子への直接的な作用が期待されるタンニン酸も併せて対照として評価した<sup>19)</sup>。その結果、タンニン酸については 1.5 (log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL) units のウイルス感染価の減少が見られたが、**4b** では感染価は減少しなかった (コントロール; 4.8、**4b** で処理した MNV; 4.7) (Figure 8)。2'-CMC や GC376 も同様に感染価を減少しなかったため、この結果から、**4b** にはウイルス粒子への直接の作用がないことが示唆された。



**Figure 8.** Antiviral activity of **4b** against MNV particle. Results from two independent experiments and data are expressed as the mean. Final concentration of compounds was 225  $\mu$ M and virus-exposure time was 60 min.

## 第 2 項 Time-of-addition アッセイ

化合物 **4b** の作用メカニズム検討のため、time-of-addition アッセイを行った。Simultaneous treatment では、CPE reduction アッセイと同様に **4b** と MNV を混和して 37 °C, 30 分間静置した後に混合液を細胞に接種し、1 時間後、細胞上清をデカント、洗浄し、培地に置き換えた。Post-infection treatment では、始めに細胞に MNV を接種して 37 °C, 1 時間静置することでウイルスに感染させ、その後、細胞上清をデカント、洗浄して化合物を含んだ培地に置き換え、3 日間培養した (Figure 9)。2'-CMC や GC376 と同様に、**4b** の抗ウイルス活性はウイルス感染後の化合物処理であっても保持された。この結果から、**4b** はウイルス感染の初期段階であるウイルスの宿主細胞への接着または侵入の過程を阻止していないことが示唆された。さらに、**4b** はどちらの評価方法でも 2'-CMC や GC376 よりも高い活性を示したほか、post-infection treatment では化合物の処理時間が延長されたことで、さらに高い活性値を得た (Table 6)。



**Figure 9.** Protocols for time-of-addition assays.

**Table 6.** Time-of-addition assay results.

Conditions	EC <sub>50</sub> (μM)		
	<b>4b</b>	2'-CMC	GC376
Simultaneous treatment <sup>a</sup>	0.53	56	>100
Post-infection treatment <sup>b</sup>	0.041	4.6	68

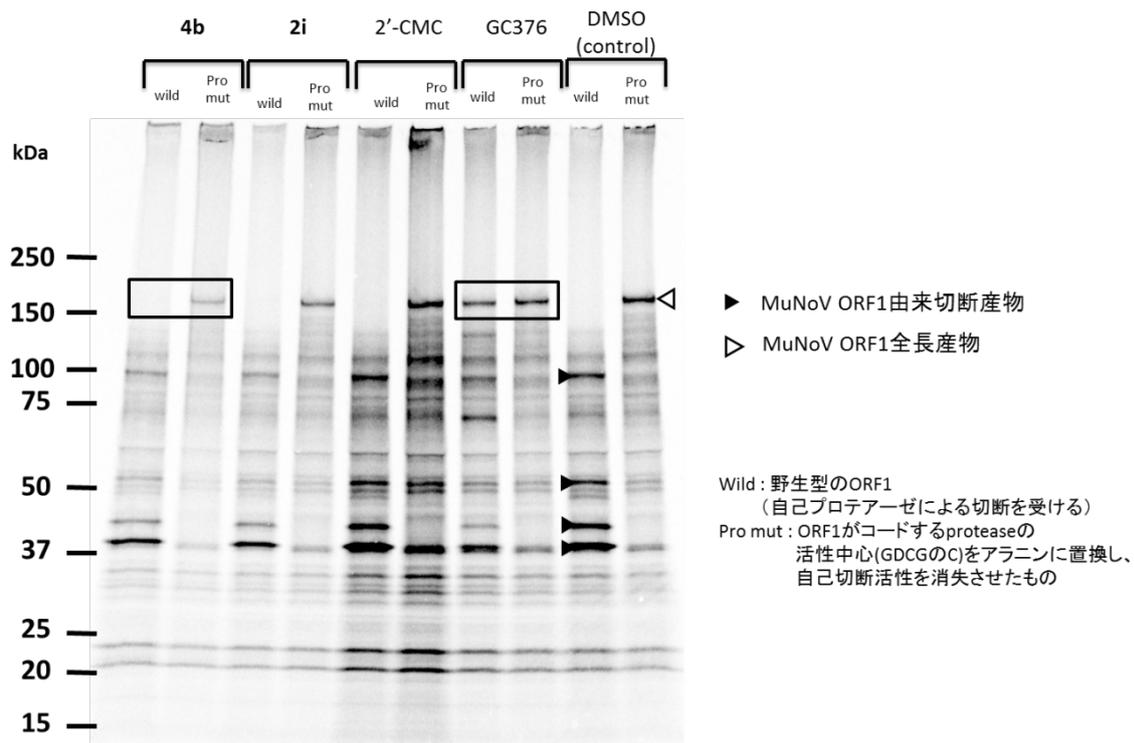
Results from two independent experiments performed in duplicate. Effect of changing the infection order.

a) Compounds and virus were exposed to cells simultaneously for 1 h.

b) After viral infection for 1 h, cells were treated with compounds for 72 h.

### 第 3 項 プロテアーゼ活性阻害の検討 (*In vitro* transcription/translation アッセイ)

ウイルス複製過程への作用を調べるため、**4b** の MNV プロテアーゼへの作用を *in vitro* transcription/translation system<sup>45)</sup> で評価した。プロテアーゼの活性中心のアミノ酸配列 GDCG (グリシン - アスパラギン酸 - システイン - グリシン) のシステイン残基をアラニンに置換した変異株および野生株を用いて **4b**, **2i** (不活性類縁体), 2'-CMC および GC376 のプロテアーゼ阻害活性を評価した。その結果、GC376 のみにおいて野生株でプロテアーゼ阻害が確認されたが、他の化合物では阻害効果が確認できなかった (Figure 10)。このことから、**4b** の作用メカニズムは、プロテアーゼ阻害活性を介したものではないことが示された。



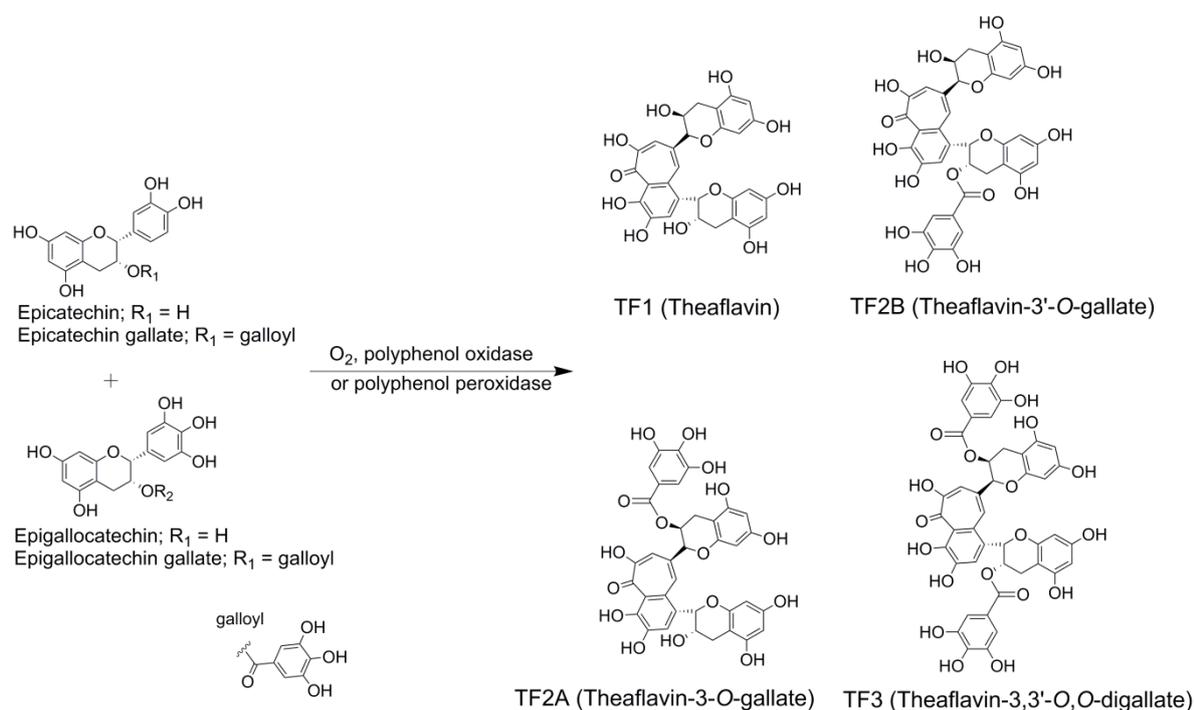
**Figure 10.** Evaluation of inhibitory activity of **4b** against MNV protease by *in vitro* transcription/translation assay.

### 第 3 節 小括

3 種のヒトノロウイルス代替ウイルスを用いた cell-based スクリーニングによって抗ノロウイルス活性を有する化合物を探索した結果、MNV 特異的な抗ウイルス作用を示す化合物として 5-bromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (**1**) を得た ( $EC_{50} = 37 \mu\text{M}$ )。さらに **1** のチオフェン部、ベンゾチアゾール部について構造活性相関研究を行い、より高活性な化合物の創出に成功した。例えば、5-クロロチオフェン体 **2b** ( $EC_{50} = 30 \mu\text{M}$ )、3,5-ジブロモチオフェン体 **2j** ( $EC_{50} = 24 \mu\text{M}$ )、3,5- および 4,5-ジクロロチオフェン体 **2k**, **2m** ( $EC_{50} = 6.6 \mu\text{M}$  および  $24 \mu\text{M}$ )、4,6-ジフルオロベンゾチアゾール体 **3j** ( $EC_{50} = 5.6 \mu\text{M}$ ) である。構造活性相関研究から、二置換体は一置換体よりも活性が向上する傾向があることがわかった (e.g., **3j**,  $EC_{50} = 5.6 \mu\text{M}$  vs **1**,  $EC_{50} = 37 \mu\text{M}$ )。また、高活性の誘導体 **2b**, **2j**, **2k**, **2m** および **3j** 由来の構造を組み合わせることによって、ハイブリッド化合物 **4a-d** を合成した。興味深いことに、チオフェン部とベンゾチアゾール部で最も活性の高かった **2k** と **3j** の組合せである **4c** ( $EC_{50} = 1.1 \mu\text{M}$ ) よりも、3,5-ジブロモチオフェン (**2j** 由来) と 4,6-ジフルオロベンゾチアゾール (**3j** 由来) の組合せによる四置換ハロゲン体 (**4b**) が最も高い活性を示した ( $EC_{50} = 0.53 \mu\text{M}$ )。作用メカニズム解析のため、遠心式フィルターを用いた  $TCID_{50}$  アッセイを行うことで、**4b** のウイルス粒子への直接の作用を検証した。その結果、**4b** でウイルスを処理しても感染価は減少しないことから、**4b** の抗ウイルスメカニズムはウイルス粒子への直接の作用ではないことが示唆された。対照として用いたタンニン酸は同条件で感染価を低減させたことから、ウイルス粒子へ作用していることが示唆された。ウイルス粒子への作用を介さない抗ウイルスメカニズムとしては、以下の 3 つが挙げられる。(1) ウイルス感染の初期段階 (接着、侵入)、(2) ウイルスタンパクの複製 (RdRp および 3CL pro) および (3) ウイルス感染の最終段階 (ウイルスの放出) である<sup>7, 26)</sup>。Time-of-addition アッセイの結果、**4b** は宿主細胞内のウイルス複製を阻害することが知られている 2'-CMC および GC376 と同様の挙動を示した。このことから、**4b** は宿主細胞内でのウイルス複製を阻害するか、もしくは感染の最終段階を阻害することが示唆された。さらに、**4b** は 2'-CMC や GC376 よりも低濃度で抗ウイルス活性を示した。また、ウイルス複製のターゲットの一つであるプロテアーゼ阻害作用を *in vitro* transcription/translation system により評価したが、プロテアーゼ阻害活性は確認できなかった。これらの結果から、**4b** の作用メカニズムは、ウイルスの宿主細胞内での複製過程 (ただし、プロテアーゼ阻害作用を除く) もしくは宿主細胞からの放出過程であることが示された。プロテアーゼ阻害活性の実験では、**4b** の ORF1 全長産物のタンパク質量が、control や他の化合物で処理したものと比較して少なく、系内での転写やタンパクの翻訳が阻害されている可能性がある。**4b** の複素環カルボキサミド構造は、詳細なメカニズムは不明であるものの抗ノロウイルス薬として臨床試験中の nitazoxanide<sup>33)</sup> と類似している。そのため、**4b** をはじめ合成した誘導体は、複素環カルボキサミド誘導体の抗ウイルスメカニズム解明のためのツールとしても有用であると考えられる。今後、さらなる作用メカニズムの解析が必要である。

### 第 3 章 テアフラビン類の活性評価と作用メカニズムの解析

テアフラビン類は紅茶に特有のポリフェノールであり、高い抗酸化作用や抗インフルエンザウイルス作用が知られる生理活性物質である<sup>46-48)</sup>。茶葉から紅茶を製造する過程で、ポリフェノールオキシダーゼやポリフェノールペルオキシダーゼの作用によってカテキン類 (エピカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキン、エピガロカテキンガレート) が酸化重合して生成する。没食子酸エステルの数、結合位置によって 4 種類のテアフラビン類が存在することが知られており、それぞれテアフラビン (TF1)、テアフラビン-3-*O*-ガレート (TF2A)、テアフラビン-3'-*O*-ガレート (TF2B)、テアフラビン-3,3'-*O,O*-ジガレート (TF3) と呼ばれている (Scheme 3)<sup>49)</sup>。スクリーニングにおけるヒット化合物である "Theaflavin monogallates" は TF2A と TF2B の混合物 (混合比は不明) であり、"Theaflavin digallate" は、TF3 である。



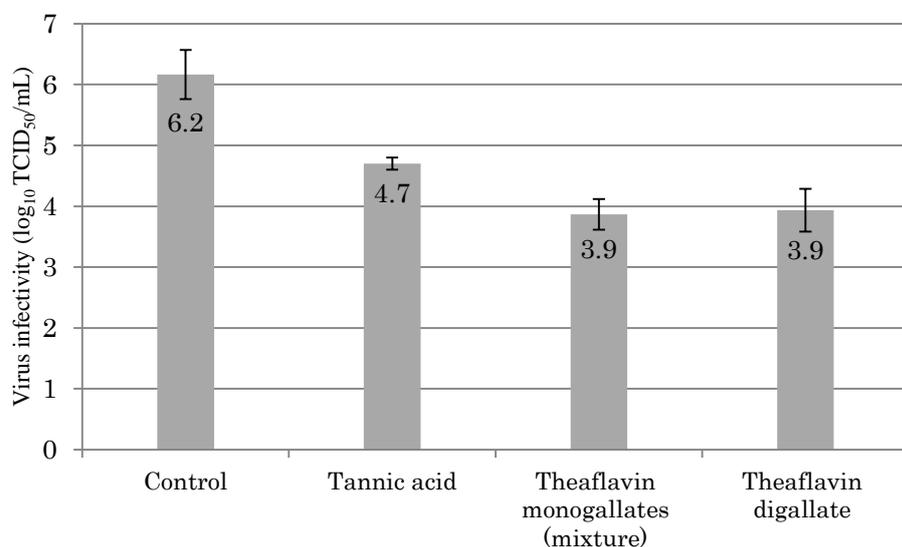
**Scheme 3.** Formation of theaflavins from catechins.

#### 第 1 節 テアフラビン類の活性評価と作用メカニズムの解析

##### 第 1 項 遠心式フィルターを用いた TCID<sub>50</sub> アッセイ

スクリーニングヒットした 2 つの化合物について、第 2 章第 2 節第 1 項と同様に TCID<sub>50</sub> アッセイを行うことでウイルス粒子への作用を評価した (Figure 11)。陽性対照として用いたタンニン酸は、抗 FCV 活性を有することが報告されている化合物である<sup>50)</sup>。ウイルスは、スクリーニングの際とは異なる FCV F-9 株 (ATCC VR-782) を用いた。異なる株を用いることで、より広域なスペクトルを有する化合物であることを検証するためである。TCID<sub>50</sub> アッセイの結果、テアフラビン類 2 化合物はウイルス感染価を 2.3 (log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL) units 減

少した。このことから、これらの化合物はウイルス粒子に直接作用することで抗 FCV 活性を示していることが示唆されるとともに、スクリーニングに用いた 3 種の代替ウイルスだけでなく、FCV F-9 株にも活性を示すことが判明した。さらにその活性は、タンニン酸よりも約 10 倍高活性であった。

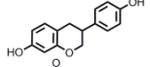
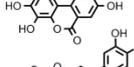
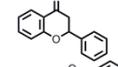
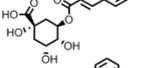
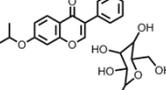
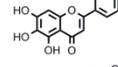
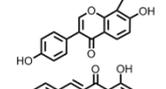
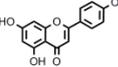
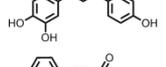
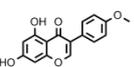
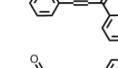
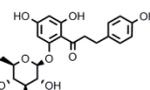
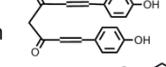
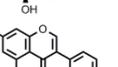
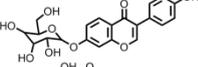
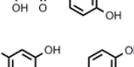
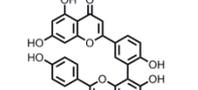
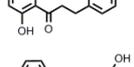
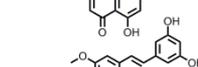
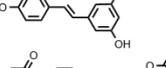
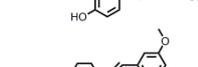
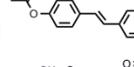
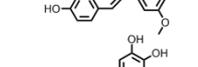
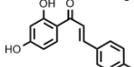
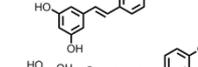
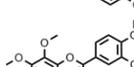
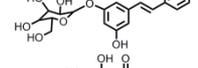
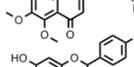
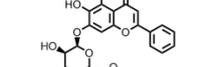
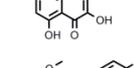
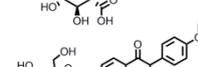
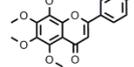
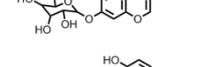
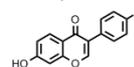
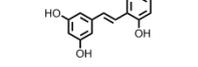
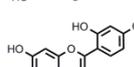
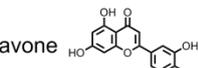


**Figure 11.** Antiviral activity of theaflavins against FCV particle. FCV F-9 strain was used. Results from three independent experiments and values represent mean  $\pm$ S.D. Final concentration of compounds was 225  $\mu$ M and virus-exposure time was 60 min.

## 第 2 項 ポリフェノール類の活性評価

ポリフェノール類は抗微生物活性を有することが知られている<sup>20)</sup>。序論で述べた通り、柿抽出物、ブドウ種子および赤ワインの抗ノロウイルス活性が報告されており、その活性は当該食品中に含まれるポリフェノールによるものとされている<sup>19-23)</sup>。テアフラビン類もまたポリフェノール的一种であることや、さらにポリフェノール類化合物の中には、RdRp 阻害活性が報告されている (*E*)-2-styrylchromone<sup>32)</sup> と構造的に近いものがあることから、他のポリフェノールの抗ノロウイルス活性に興味を持たれる。そこでポリフェノール類化合物約 40 種について、TCID<sub>50</sub> アッセイによって FCV F-9 株への活性を評価した。しかし、テアフラビン類と同等以上の活性を示す化合物はなかった。評価したポリフェノール化合物と、化合物処理後のウイルス感染価を Table 7 に示した。

**Table 7.** Anti-FCV activity of polyphenols.

Polyphenols	Structure	Virus infectivity (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /mL)	Polyphenols	Structure	Virus infectivity (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /mL)
Control		6.0	Equol		6.2
Ellagic acid		5.7	Flavonone		5.5
Chlorogenic acid		6.0	Ipriflavone		5.9
Baicalein		5.9	Puerarin		5.9
Apigenin		6.2	Butein		5.9
Biochanin A		5.9	Chalcone		6.2
Phloridzin		5.5	Bisdemethoxycurcumin		5.5
Genistein		6.6	Daidzin		5.9
Phloretin		5.2	Amentoflavone		5.9
Resveratrol		5.9	Isorhapontigenin		5.9
Triacetylresveratrol		5.5	Pterostilbene		6.2
Isoliquiritigenin		6.6	Piceatannol		5.5
Nobiletin		5.2	Piceid		5.9
Kaempferol		5.9	Baicalin		5.9
Tangeritin		6.2	Ononin		6.6
Formononetin		5.9	Gnetol		5.9
Morin		5.9	3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone		5.5
Oxyresveratrol		6.6	Rhapontigenin		5.9
Chrysin		5.9	Cyaninechloride		5.9

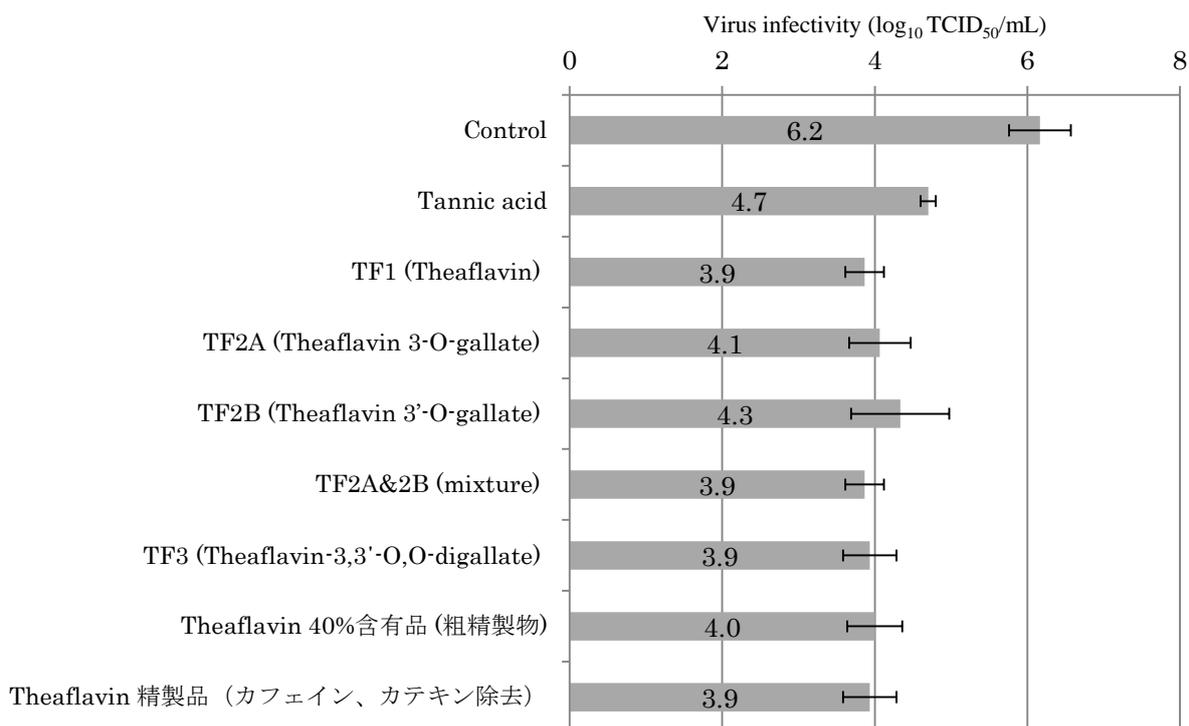
FCV F-9 strain was used. Result from single experiment. Final concentration of compounds was 225  $\mu$ M and virus-exposure time was 60 min.

### 第 3 項 テアフラビン類の活性評価

テアフラビン類の個々の活性を評価するため、Table 8 に記載のテアフラビンサンプルを収集し、上述の TCID<sub>50</sub> アッセイを行った (Figure 12)。サンプル No.1, 2, 3, 5 はテアフラビン類単体、No.4 はヒット化合物と同じ 2 種類のモノガレートの位置異性体混合物である。No.6 はカテキン類と茶葉から合成した粗精製物でテアフラビン類を 40 質量% 含有するもの、No.7 はNo.6 を精製しカフェインおよびカテキンを除去してテアフラビン類の含量を 90–95 質量% まで高めたものである (No.4, 6, 7 中のテアフラビン類の混合比は不明)。混合物である No.6 および No.7 の濃度は、テアフラビンモノガレートの分子量 716.6 を用い、他のサンプルと同じ終濃度である 225 μM になるよう調製した (0.16 mg/mL に相当)。TCID<sub>50</sub> アッセイの結果、テアフラビンサンプルはいずれもウイルス粒子に直接作用することが示唆された。また、粗精製物である “テアフラビン 40% 含有品” を含むすべてのテアフラビンサンプルが同程度の抗 FCV 活性を示した (1.9–2.3 (log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL) units)。また、分子中に没食子酸エステルを有さないテアフラビン (TF1) も TF2A, TF2B, TF3 と同様に活性を示すことから、没食子酸エステル部は活性に寄与していないことが示唆された。実際にスクリーニングに供した 2080 化合物の中に没食子酸が含まれていたが、各ウイルスへの活性は確認できなかった。

**Table 8.** Samples of theaflavins.

サンプルNo.	名称
1	TF1 (Theaflavin)
2	TF2A (Theaflavin-3-O-gallate)
3	TF2B (Theaflavin-3'-O-gallate)
4	TF2A&2B (mixture)
5	TF3 (Theaflavin-3,3'-O,O-digallate)
6	Theaflavin 40% 含有品 (粗精製物)
7	Theaflavin 精製品 (カフェイン、カテキン除去)

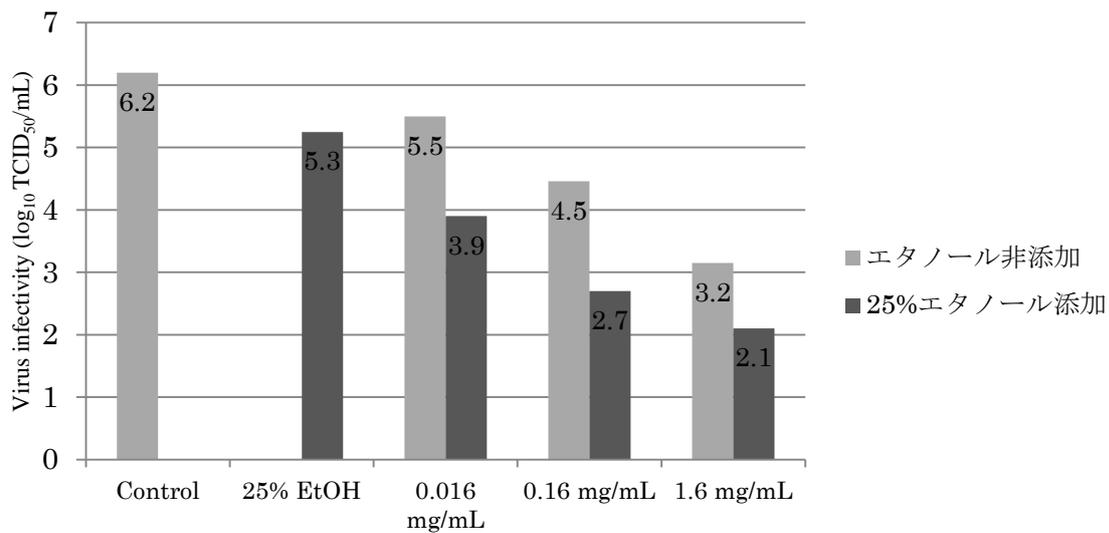


**Figure 12.** Anti-FCV activity of various theaflavins. FCV F-9 strain was used. Results from three independent experiments and values represent mean  $\pm$ S.D. Final concentration of compounds was 225  $\mu$ M and virus-exposure time was 60 min.

テアフラビン類はウイルス粒子に直接作用することが示唆されたため、消毒薬などの衛生製品に応用することを想定し、以降の評価を行った。製剤化において大量のテアフラビン類が必要となる可能性が高いことから製造コストを考慮し、テアフラビン類 4 種の混合物である No.6 もしくは No.7 を使用することが考えられたが、テアフラビン類のみの作用を評価するため、No.7 のテアフラビン精製品 (カフェイン、カテキン除去) を選択し、以降の評価に使用した。

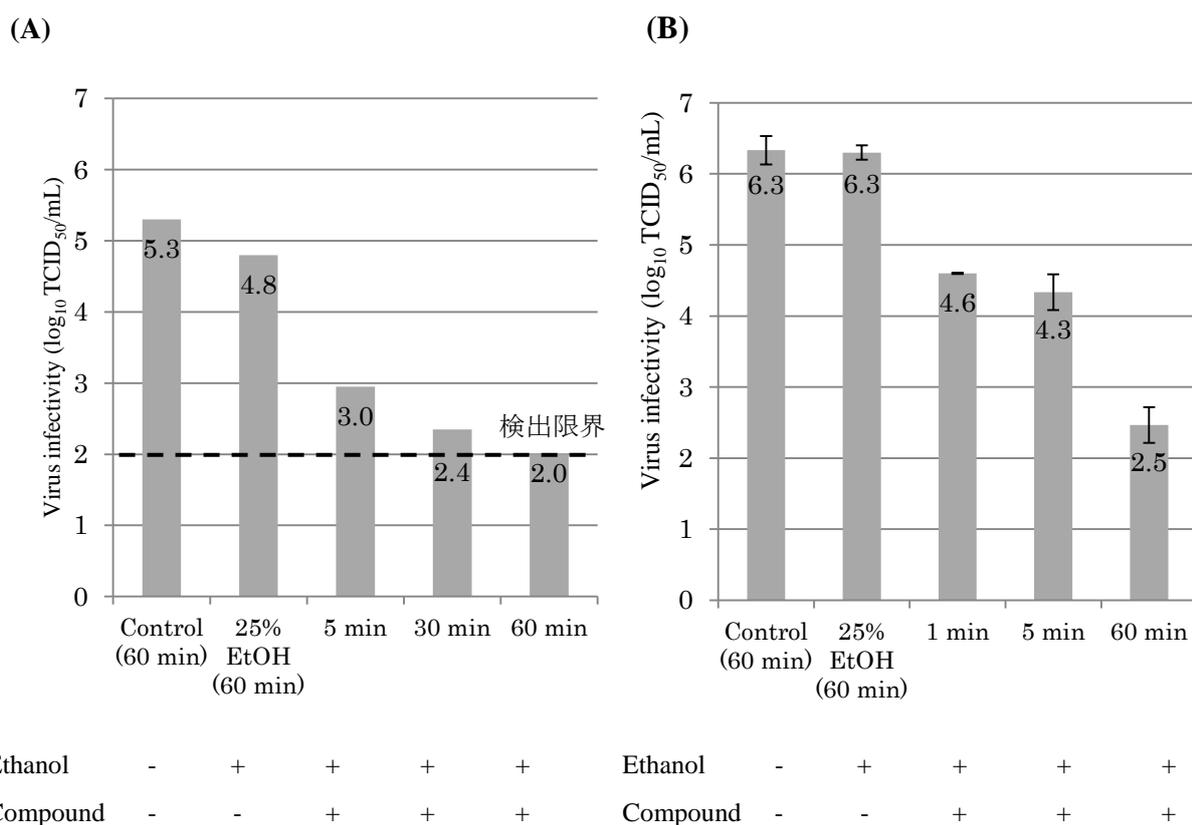
#### 第 4 項 テアフラビン類の濃度および感作時間の検討

テアフラビン精製品を用いて、濃度変化とエタノール添加による活性を比較した (Figure 13)。その結果、濃度依存的に活性が向上し、1.6 mg/mL では 3.0 ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL) units 感染価が減少した。エタノールの添加は消毒薬への応用を想定して行ったが、FCV にエタノール感受性があり、試験前の評価では 40% のエタノール添加で 3.0 ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL) units の感染価の減少がみられたため、添加濃度を 25% に設定した。エタノールを 25% 添加した場合には、エタノールそのものの抗ウイルス活性が若干みられたものの、さらに活性が向上し、1.6 mg/mL では 4.1 ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL) units 感染価が減少した。活性が向上した要因としては、エタノールによって反応液中におけるテアフラビン類の溶解性が増したことが考えられる。



**Figure 13.** Effect of ethanol addition on the concentration-dependent anti-FCV activity of theaflavins. FCV F-9 strain was used. Results from two independent experiments and values represent mean. Virus-exposure time was 60 min.

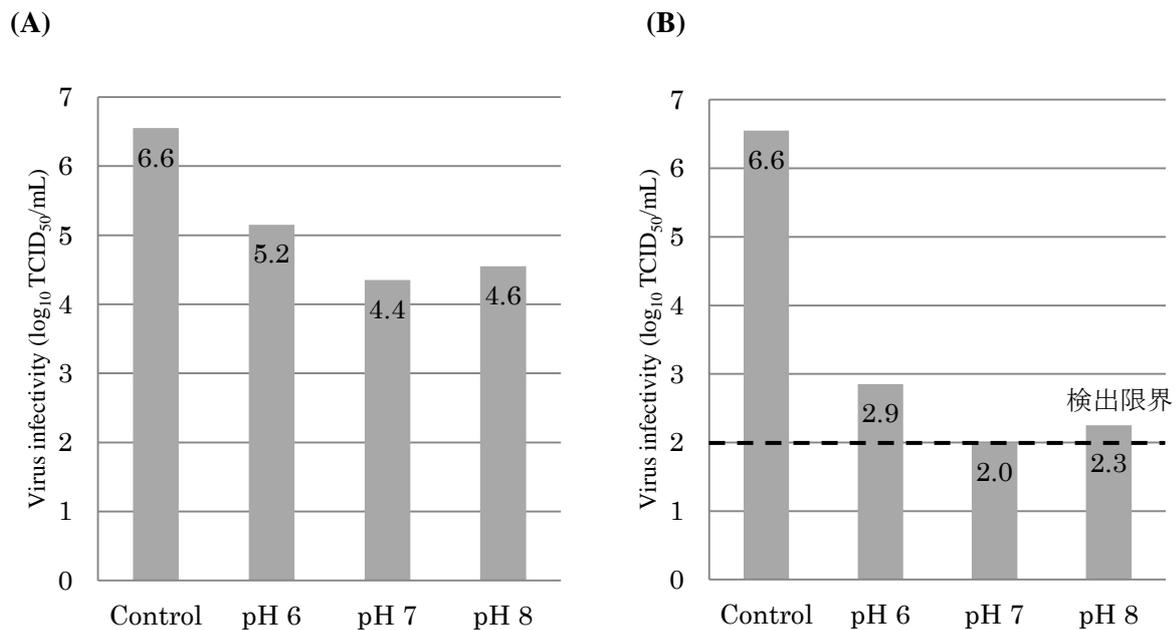
次に、Figure 13 で最も高い活性を示した 1.6 mg/mL, 25% エタノール添加の条件で、感作時間による抗 FCV 活性の変化を比較した (Figure 14A)。ウイルスの感染価は感作時間の増加にともなって減少する傾向があるが、5 分間の感作でも 2.3 ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL) units 感染価が減少した。さらに抗 MNV 活性についても FCV と同様に時間依存的に活性が向上したが、1 分間の感作で 1.7 ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL) units 感染価を減少した。なお、MNV は 50% エタノールへの 15 秒間の感作によって感染価が 5 ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL) units 以上減少することが報告されているが<sup>14)</sup>、25 % エタノールへの 60 分間の感作では MNV の感染価に影響はみられなかった (Figure 14B)。



**Figure 14.** Effect of virus-exposure time on the anti-FCV or the anti-MNV activity of theaflavins. Final concentration of compounds was 1.6 mg/mL and 25% EtOH was added. (A) FCV F-9 strain was used. Results from two independent experiments and values represent mean. (B) MNV S-7 strain was used. Results from three independent experiments and values represent mean  $\pm$ S.D.

## 第 5 項 pH の変化による活性への影響

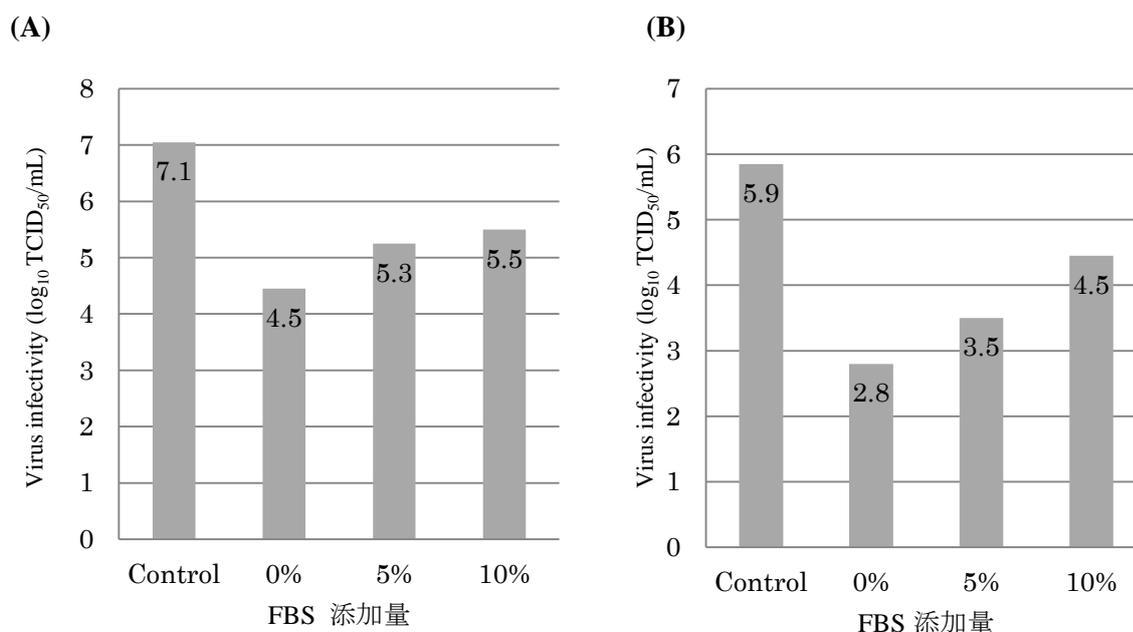
次に、抗ウイルス作用に及ぼす pH の影響を評価した。手指の消毒に使用する場合を想定し、pH を 6, 7 および 8 に調整した培地を用いてテアフラビン精製品 1.6 mg/mL 溶液をそれぞれ調製し、ウイルスに 60 分間感作させた際の感染価の変化を評価した。FCV, MNV とともに中性付近の pH では大きな活性への影響はみられなかったが、pH 6 および 8 では、pH 7 に比べ活性が減弱する傾向が確認された (Figure 15)。テアフラビン類を殺菌・消毒薬の有効成分として使用する場合、消毒対象としては手指や器具のほか、吐瀉物が付着した床なども考えられるため、吐瀉物の処理に用いる場合を考慮して、より酸性側の pH についても検討する必要がある。



**Figure 15.** Effect of medium pH on the anti-FCV or the anti-MNV activity of theaflavins. Results from two independent experiments and values represent mean. Final concentration of compounds was 1.6 mg/mL and virus-exposure time was 60 min. (A) FCV F-9 (B) MNV S-7

## 第 6 項 共存タンパクの活性への影響

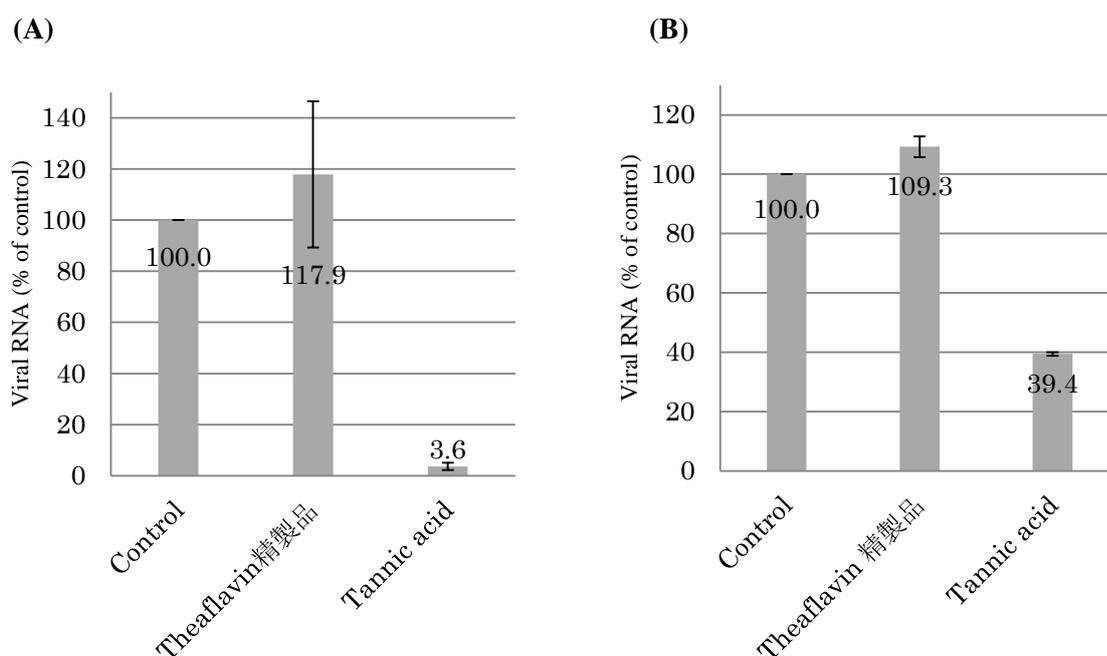
上述した通り、殺菌・消毒薬の用途としては、吐瀉物の処理なども考えられる。吐瀉物中にはノロウイルス以外に夾雑タンパク質が相当量含まれるため、タンパク質共存下でも抗ウイルス活性を保持することが望ましい。FBS (ウシ胎児血清: fetal bovine serum) を夾雑タンパク質の代用として、FBS 存在下での抗 FCV および MNV 活性を評価した。すなわち、FBS 濃度を 0%, 5%, 10% に調整した培地を用いてテアフラビン精製品 1.6 mg/mL 溶液をそれぞれ調製し、ウイルスに 60 分間感作させた際の感染価の変化を評価した。Figure 16 に示した通り、どちらのウイルスに対する活性も、FBS の添加濃度とともに減弱した。このことから、テアフラビン類の抗ノロウイルス活性は共存タンパクの影響を受けやすいということが判明するとともに、その作用機序は非特異的なタンパク吸着であることが示唆された。FBS 10% 添加時においても 1.4–1.6 ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL) units の活性が保持されたが、殺菌・消毒薬へ応用する場合は、比較的有機物の少ない環境下での使用を推奨することや、ウェットティッシュ、ハンドソープなど手指への使用が中心となるような製品とすることが必要であると考えられる。



**Figure 16.** Effect of FBS on the anti-FCV or the anti-MNV activity of theaflavins. Results from two independent experiments and values represent mean. Final concentration of compounds was 1.6 mg/mL and virus-exposure time was 60 min. (A) FCV F-9 (B) MNV S-7

## 第 7 項 リアルタイム PCR によるウイルス RNA 量の評価

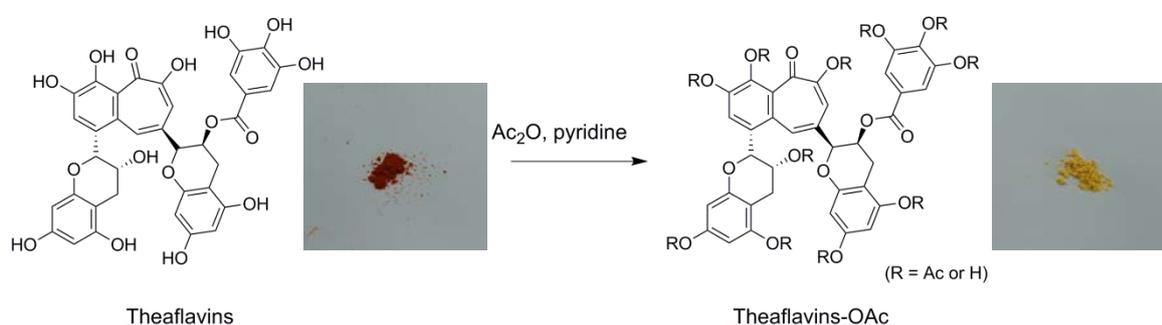
序論でも述べた通り、ヒトノロウイルスを細胞系で効率的に増殖させる技術は未だ開発されていない。引用文献 20 および 21 では、柿抽出物で処理したヒトノロウイルス液に残存するウイルス RNA 量を、リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) で測定することで、抗ノロウイルス活性を評価している。そこで、静岡県環境衛生科学研究所において保管されているヒトノロウイルス患者糞便検体を用い、テアフラビン類を同様の方法で評価した。陽性対照としては柿抽出物中の主成分と考えられるタンニン酸を使用し、濃度は TCID<sub>50</sub> アッセイでの最大濃度と同程度のモル濃度である 2.5 mM とした。テアフラビン精製品 (カフェイン、カテキン除去) はテアフラビンモノガレート分子量 716.6 を用いてサンプルを調製した (1.8 mg/mL)。その結果、タンニン酸ではウイルス RNA 量の減少がみられたが、テアフラビン類では減少しなかった (Figure 17A)。Figure 17B に示した通り、cell-based の評価系で活性を示した MNV でも RNA 量の減少が見られなかったことから、テアフラビン類はウイルス粒子に直接作用するが、ウイルス RNA には影響を及ぼさないことが示された。このことにより、先述の非特異的なタンパク吸着が作用メカニズムである可能性が高まった。



**Figure 17.** Anti-human norovirus or anti-MNV activity of theaflavins as quantified by measuring viral RNA levels by means of qRT-PCR. Results from three independent experiments and values represent mean  $\pm$ S.D. Final concentration of compounds was 2.5 mM and virus-exposure time was 60 min. (A) Human norovirus GII.4 (B) MNV S-7

## 第 8 項 アセチル化によるテアフラビン類の化学修飾

テアフラビン類は紅茶の色素成分であり、その粉末は鮮やかな赤色を呈するが、殺菌・消毒薬に配合する場合、その色によって消毒対象である衣類や器具が着色する恐れがある。そこで化学修飾による脱色を試みた。すなわち、テアフラビン精製品を用いたアセチル化反応と生成物の活性評価を行った。テアフラビン類の構造中に存在する複数の水酸基は、無水酢酸およびピリジンによって容易にアセチル化され、生成したアセチル体は淡黄色の粉末であった (Figure 18)。LC/MS によって、テアフラビンモノガレート の 11 個の水酸基のうち 9 個がアセチル化された化合物を主生成物として確認した。しかし、アセチル体を FCVF-9 株および MNV で評価したところ、活性は確認できなかった。このことから、化学修飾による脱色は可能であるが、抗ノロウイルス活性が消失することが明らかとなり、テアフラビン類の水酸基が活性の発現に重要であることが示唆された。

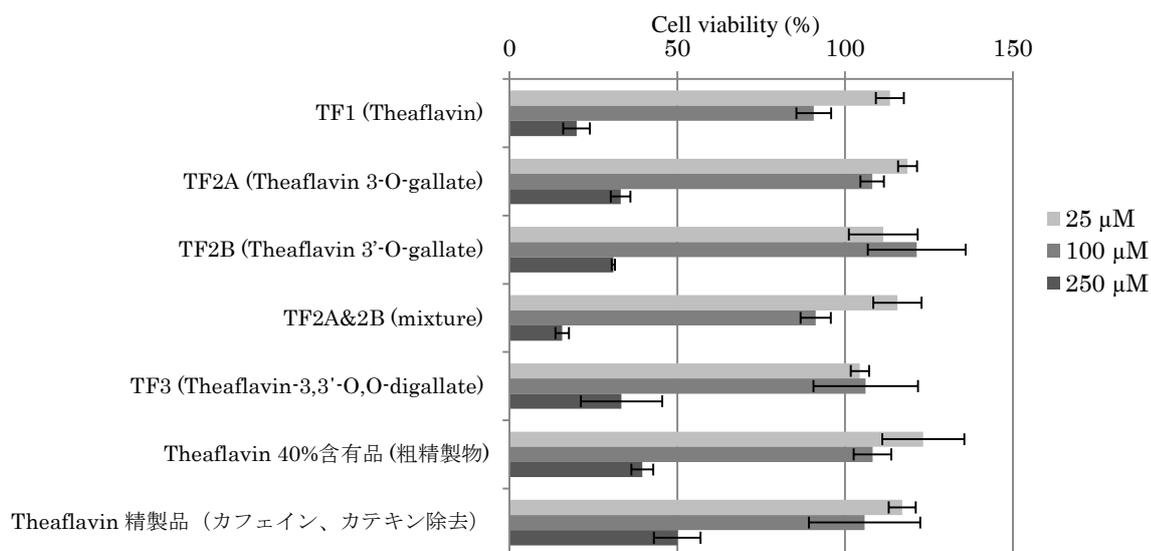


**Figure 18.** The apparent change in the color induced by acetylation of theaflavins. The LC/MS analysis displayed that the main product had nine of *O*-acetylated group.

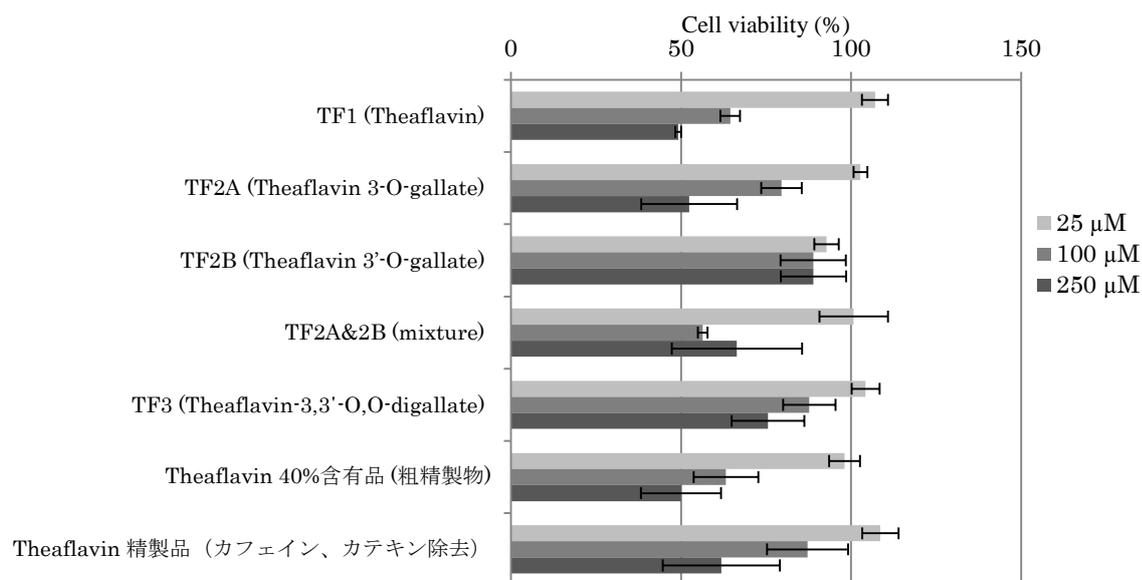
## 第 9 項 テアフラビン類の細胞毒性評価

ヒト正常細胞への毒性を評価するため、ヒト胎児肺由来の繊維芽細胞である WI-38 および MRC-5 への細胞増殖阻害を試験した (Figure 19)。濃度は 25, 100, 250  $\mu\text{M}$  の 3 点で評価し、テアフラビン 40% 含有品 (粗精製物) およびテアフラビン精製品 (カフェイン、カテキン除去) はテアフラビンモノガレートの分子量 716.6 を用いてサンプルを調製した (0.018, 0.072, 0.18 mg/mL に相当)。25  $\mu\text{M}$  (テアフラビン 40% 含有品およびテアフラビン精製品は 0.018 mg/mL) ではいずれの化合物も両細胞ともに増殖阻害を示さなかったが、100  $\mu\text{M}$  (テアフラビン 40% 含有品およびテアフラビン精製品は 0.072 mg/mL) では WI-38 細胞において一部の化合物が増殖阻害作用を示し、250  $\mu\text{M}$  (テアフラビン 40% 含有品およびテアフラビン精製品は 0.18 mg/mL) では両細胞ともにすべての化合物で細胞生存率が大きく低下した。紅茶として飲用する際のテアフラビン類の濃度は茶葉の品種により異なるが、一般的に飲用されているセイロン種で 0.15 mg/mL であることから<sup>51)</sup>、殺菌・消毒薬として一時的に接触する場合、人体へ大きな影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

(A)



(B)



**Figure 19.** Cytotoxicity of various theaflavins against normal human fibroblast cell lines. Cytotoxicity was evaluated by the WST-8 assay. Cells were treated with dilution series of each compound for 72 h (in triplicate). (A) WI-38 cell (B) MRC-5 cell

## 第 2 節 小括

テアフラビン類には没食子酸エステルの数や結合位置の違いで 4 種類あることが知られている。スクリーニングとは異なる FCV F-9 株を用いて、これら 4 種およびその混合物を評価したところ、すべてが同程度の抗 FCV 活性を示した。テアフラビン類混合物を用いた濃度、反応時間の検証では、その効果が濃度および反応時間の増加にともなって向上することが示され、さらに MNV へも高い活性を有することが確認された。また、これらの評価は遠心式フィルターを用いた TCID<sub>50</sub> アッセイにより行ったことから、その作用はウイルス粒子に直接影響を及ぼすことによって生じていることが示唆された。殺菌・消毒薬の有効成分としての使用を想定し、pH や 共存タンパクの影響を試験したところ、中性付近の pH では活性は大きく変化しないこと、共存タンパクの影響を受けやすいことがわかった。ヒトノロウイルス患者検体および MNV を用いたリアルタイム PCR での評価では、ウイルスの RNA 量には影響を与えず、既存の抗ノロウイルス化合物である柿抽出物とは違ったメカニズムでウイルスを不活化していることが示された。また、テアフラビン類は紅茶由来の色素成分であることから、殺菌・消毒薬としての利用には消毒対象の着色が問題になると考え、アセチル化による脱色を試みた。生成したアセチル体は淡黄色の粉末であり、化合物自体の色は薄くなったものの、抗 FCV および MNV 活性は消失していた。これらの検証から、テアフラビン類の作用メカニズムとして、非特異的なタンパク結合であること、水酸基が活性の発現に寄与していることが示唆された。また、消毒薬として使用するためには、共存タンパクが比較的少ない環境下で使用すること、着色が問題とならないような利用方法や低濃度で活性を示すことができるような処方を考案するなどの課題が明らかとなった。しかし、スクリーニングを含め 3 種類 4 株 (FCV 2280 strain, FCV F-9 strain, MNV, PoSaV) のヒトノロウイルス代替ウイルスを不活化したことから広域スペクトルを有する化合物であると考えられること、古くから飲用されてきた紅茶由来の化合物であるために一般的に受け入れやすいことから、本化合物はノロウイルス対策製品の有効成分として非常に有用であると考えられる。

## 総括

ノロウイルスは、食中毒および感染症による急性ウイルス性胃腸炎の主要な病原体であり、乳幼児や高齢者、免疫不全患者等では重症化し、死に至ることもある恐ろしいウイルスである。しかし、抗ノロウイルス薬の研究が盛んに行われているにもかかわらず、治療・予防薬として上市され、医療現場で使用されているものは未だにない。また、手指等にも使用可能な殺菌・消毒薬として厚生労働省に認められているものも未だなく、石けんで十分に手を洗うことが唯一の予防法となっている。そのため、ノロウイルスの治療・予防薬、新たな殺菌・消毒薬の開発が強く望まれている。

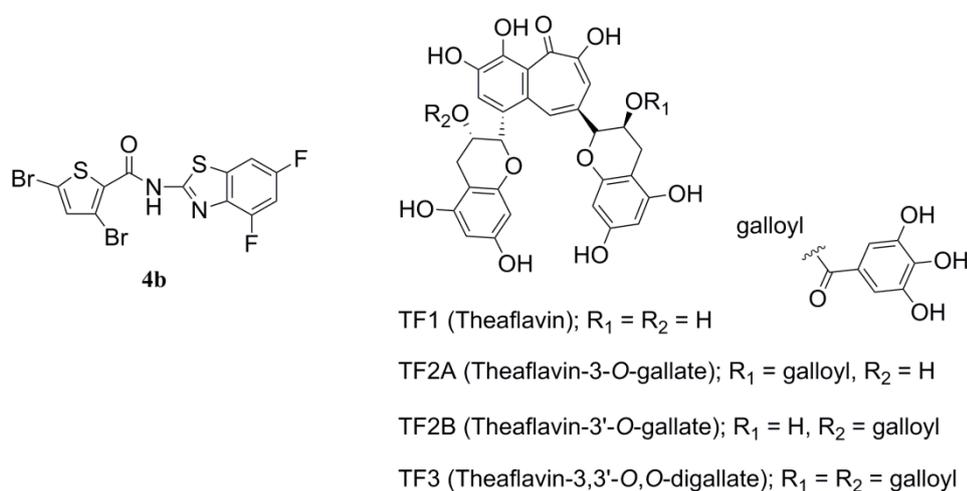
ノロウイルスの研究が遅れている最も大きな理由は、ヒトノロウイルスを効率良く増殖させることができる細胞培養系が確立されていないことが挙げられる。そこで、一般的に抗ノロウイルス薬の評価は近縁のウイルスを用いて行われている。本研究では、ヒトノロウイルス代替ウイルスとして FCV, MNV, PoSaV の 3 種のウイルスを用いて抗ノロウイルス化合物の探索を行った。

第 1 章では、既報の抗ノロウイルス化合物に関する知見を参考に、in-house ライブラリーから約 2000 化合物を選抜し、3 種の代替ウイルスを用いて細胞系でのスクリーニングを行った。スクリーニングにあたり、治療・予防薬または殺菌・消毒薬としての活性を有する化合物を探索するために、作用機序を限定せず、ウイルス接種による CPE を抑制する評価系を用いた。スクリーニングの結果、7 種の化合物をヒット化合物として同定した。

第 2 章では、スクリーニングにおけるヒット化合物のうち、MNV 特異的に抗ウイルス活性を示した 5-bromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (**1**) について、類縁体合成による構造活性相関研究および作用メカニズムの検討を行った。すなわち、**1** のチオフェン-ベンゾチアゾールカルボキサミド骨格を鍵骨格とし、チオフェン環、ベンゾチアゾール環上の置換基の変換を中心に約 50 個の類縁体を合成し、それぞれの活性を MNV を用いた CPE reduction アッセイによって、細胞毒性を RAW264.7 細胞を用いた WST-8 アッセイによって評価した。その結果、一部の化合物に細胞毒性が懸念されたが、チオフェン環、ベンゾチアゾール環ともに二置換ハロゲン体が活性を向上させる傾向があることを見出した。さらに活性を増強させるため、高活性を示した誘導体 **2b**, **2j**, **2k**, **2m** および **3j** 由来の構造を組み合わせることによって、ハイブリッド化合物 **4a-d** を合成したところ、3,5-ジブロモチオフェン (**2j** 由来) と 4,6-ジフルオロベンゾチアゾール (**3j** 由来) を組み合わせた四置換ハロゲン体 **4b** (Figure 20) が **1** の約 70 倍の活性を示した (**4b**, EC<sub>50</sub> = 0.53 μM vs **1**, EC<sub>50</sub> = 37 μM)。 **4b** の作用メカニズム解明のため、遠心式フィルターを用いた TCID<sub>50</sub> アッセイを行ったところ、活性は消失した。このことから、**4b** の作用メカニズムはウイルス粒子への直接の作用ではないことが示唆された。さらに time-of-addition アッセイの結果から、ウイルス感染の初期段階である宿主細胞への接着および侵入の過程にも作用しないことが示唆された。さらに、ウイルスプロテアーゼ阻害活性の評価では活性を示さなかったこと

から、この化合物のターゲットは宿主細胞内でのウイルスの複製過程（ただし、プロテアーゼを除く）もしくは宿主細胞からのウイルスの放出過程であることが示唆された。作用メカニズムに関してはさらなる検討を要するが、**4b** は既存の抗ウイルス薬である 2'-CMC や GC376 よりも低濃度で抗ウイルス活性を示したことから、ターゲット探索のツールとして、さらにはノロウイルス治療薬・予防薬のリードとしての活用が期待される。

第 3 章では、スクリーニングにおいて 3 種のウイルスすべてに活性を示したテアフラビン類の活性評価と作用メカニズムの検討を行った。テアフラビン類は紅茶由来の天然物であり、没食子酸エステルの数と結合位置の違いで 4 種存在することが知られている (TF1, TF2A, TF2B および TF3; Figure 20)。テアフラビン類 4 種および混合物について遠心式フィルターを用いた TCID<sub>50</sub> アッセイを行い、すべてに同程度の抗 FCV 活性があることが示されるとともに、ウイルス粒子に直接作用する化合物であることが示唆された。各種検討の結果、作用メカニズムとしては非特異的なタンパク結合による可能性が高いこと、構造中に没食子酸エステルを含むことは必須ではないが、水酸基が重要であることがわかった。ヒトノロウイルス患者検体を用いたリアルタイム PCR による評価では、ウイルス RNA 量に変化を与えないことから、抗ノロウイルス化合物として報告されている柿抽出物とは違う作用メカニズムをもつことが示唆された。消毒薬として使用するためには、共存タンパクが比較的少ない環境下で使用すること、着色が問題とならないよう低濃度で活性を示すことが可能な処方を考案するなどの課題が明らかとなったが、3 種類 4 株 (FCV 2 株、MNV、PoSaV) のヒトノロウイルス代替ウイルスを不活化したことから、広域スペクトルを有する殺菌・消毒薬の有効成分としての活用が期待される。



**Figure 20.** Structures of **4b** and theaflavins.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜り、多大なる御尽力をいただきました静岡県立大学大学院薬学研究院創薬探索センター教授 浅井章良先生に心より感謝の意を表しますとともに、深く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり御高閲および御指導、御鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院 生化学教室教授 鈴木隆先生、薬化学教室教授 眞鍋敬先生、生命物理化学教室准教授 石川吉伸先生に心より感謝いたします。

研究期間中、多くの御指導、御助言や温かい励ましを戴きました静岡県立大学大学院薬学研究院創薬探索センター講師 小郷尚久先生、助教 海野雄加先生 (現 帝京大学医学部医学科微生物学講座助教)、研究補助員 三好奈央様 に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、御指導、御鞭撻を賜り、貴重な御助言をいただきました国立感染症研究所ウイルス第二部主任研究官 岡智一郎先生、バイオセーフティ管理室研究員 高木弘隆先生、The Ohio State University, Department of Veterinary Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, Ohio Agricultural Research and Development Center, Prof. Linda J. Saif, Assist. Prof. Qihong Wang、静岡県環境衛生科学研究所医薬食品部部長 小和田和宏様、主査 安藤隆幸様、微生物部部長 川森文彦様、主査 池ヶ谷朝香様、技師 荒畑沙織様 に深謝いたします。

また、MNV を提供していただきました日本大学生物資源科学部獣医学科獣医微生物学研究室教授 遠矢幸伸先生に感謝いたします。

なお、本研究に際して御協力および御助言を戴きました静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府創薬探索センター諸氏、静岡県環境衛生科学研究所の皆様にご心より御礼申し上げます。

最後に、職務と学生生活を両立するにあたり、様々な面から心強く支えてくださいました静岡県職員の皆様、両親、家族、親類、および友人にご心から感謝いたします。

## 実験の部

核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR) は、JEOL AL-400 spectrometer (400 または 100 MHz) にて、dimethyl sulfoxide (DMSO)- $d_6$  中、内部標準物質としてテトラメチルシラン (0.00 ppm) を用いて測定した。化学シフト値は ppm で、カップリングコンスタント  $J$  値は Hz で表示した。また、NMR における略号は、s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), t (triplet), dt (doublet of triplets), ddd (doublet of doublet of doublets), ddt (doublet of doublet of triplets), q (quartet), m (multiplet) を用いた。液体クロマトグラム-質量分析 (LC/MS) は、Waters 2767 sample manager, 2996 photodiode array detector, 600 controller, ZQ2000 を用いた。分析用カラムには、COSMOSIL Packed Column Cholest (size 2.0 I.D.×50 mm、ナカライテスク社製) を用い、Mobile phase: A; 0.05% TFA  $\text{H}_2\text{O}$  :  $\text{CH}_3\text{CN}$  = 20 : 80, B; 0.05% TFA  $\text{H}_2\text{O}$  :  $\text{CH}_3\text{CN}$  = 70 : 30, Gradient: B (v/v) = 0, 0.5 min, B (v/v) = 0 to 100, 5 min, B (v/v) = 100, 3.5 min, B (v/v) = 100 to 0, 3 min then B (v/v) = 0, 8 min, 1.0 mL/min の条件で分析した。カラムクロマトグラフィーには、シリカゲル 60 (球状) (中性) (ナカライテスク社製) および Chromatorex NH DM1020 (富士シリシア化学社製) を用いた。薄層クロマトグラフィーには、silica gel 60 F<sub>254</sub> glass plate (0.5 mm, メルクミリポア社製)、分取用薄層クロマトグラフィーには PLC silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2 mm glass plate (メルクミリポア社製) を用いた。2'-CMC (シグマ-アルドリッチ社製)、タンニン酸 (ナカライテスク社製)、テアフラビン (TF1)、テアフラビン-3-*O*-ガラクト (TF2A)、テアフラビン-3'-*O*-ガラクト (TF2B) (長良サイエンス社製)、テアフラビン-3,3'-*O,O*-ジガラクト (TF3) (マイクロソース社製)、テアフラビン 40% 含有品 (粗精製物)、テアフラビン精製品 (カフェイン、カテキン除去) (焼津水産化学工業社製) および合成に用いた試薬は、未精製のまま反応および評価に供した。GC376 は既報の文献<sup>52)</sup>を参考に合成した。評価に供した化合物は、あらかじめ 1 mM、10 mM または 100 mM の DMSO (ナカライテスク社製) 溶液として -20 °C で保管したものをを用いた。

### 第 1 章に関する実験

#### 細胞培養

CRFK 細胞 (ATCC cat. code; CCL-94) は、minimum essential medium (MEM) (Eagle 塩および L-グルタミン添加) に、1% 非必須アミノ酸溶液、1 mM ピルビン酸ナトリウム、抗生物質 (100 U/mL ペニシリン、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシンおよび 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アムホテリシン B 含有)、10 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethane sulfonic acid (HEPES) (ライフテクノロジー社製)、非働化した 5% FBS (バイオセラ社製) を添加した培地を用いて、37 °C、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で継代培養した。スクリーニングには、増殖用培地で  $5.0 \times 10^3$  cells/well の割合で 96 ウェルプレートに播種し、24 時間以上培養したものをを用い、維持用培地には、FBS 非添加の培地を使用した。

RAW264.7 細胞 (ATCC cat. code; TIB-71) は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

(15 mg/L フェノールレッド、4500 mg/L グルコース、4 mM L-グルタミンおよび 25 mM HEPES 添加) に、抗生物質 (100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンおよび 0.25 µg/mL アムホテリシン B 含有)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (ライフテクノロジー社製)、非働化した 10% FBS (バイオセラ社製) を添加した培地を用いて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で継代培養した。スクリーニングには、増殖用培地で 5.0 × 10<sup>3</sup> cells/well の割合で 96 ウェルプレートに播種し、24 時間以上培養したものを、維持用培地には、FBS を 10% 添加した培地を使用した。

LLC-PK 細胞 (ATCC cat. code; CL-101) は、MEM (Eagle 塩および L-グルタミン添加) に、1% 非必須アミノ酸溶液、抗生物質 (100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンおよび 0.25 µg/mL アムホテリシン B 含有)、10 mM HEPES (ライフテクノロジー社製)、非働化した 5% FBS (バイオセラ社製) を添加した培地を用いて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で継代培養した。スクリーニングには、増殖用培地で 5.0 × 10<sup>3</sup> cells/well の割合で 96 ウェルプレートに播種し、24 時間以上培養したものを、維持用培地には、FBS 非添加の培地を使用した。

### ウイルス調製

FCV 2280 株 (ATCC cat. code; VR-2057) は、フラスコ内にシート状に培養した CRFK 細胞に multiplicity of infection (MOI: 細胞 1 個あたりのウイルス量) = 0.01 となるよう接種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2-3 日間培養した後、CPE を観察した。TCID<sub>50</sub> 値は Behrens-Kärber 式<sup>53)</sup> によって以下の通り算出した。細胞デブリを除去するため、培養上清を 10,000 × g、1 時間遠心し、遠心上清を使用時まで -80 °C で保管した。スクリーニングには、100 TCID<sub>50</sub>/50 µL に希釈したものをを用いた。

$$\text{TCID}_{50} = (1 \text{ 列目の希釈倍率}) \times (\text{希釈倍率})^{\Sigma-0.5}$$

Σ: 各希釈段階における (変性 50% 以上のウェル数) / (検体数) の総和

MNV S-7 株 (日本大学生物資源科学部獣医学科獣医微生物学研究室 遠矢幸伸教授より分与) は、フラスコ内にシート状に培養した RAW264.7 細胞に MOI = 0.01 となるよう接種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2-3 日間培養した後、CPE を観察した。TCID<sub>50</sub> 値は Behrens-Kärber 式によって算出した。細胞デブリを除去するため、培養上清を 10,000 × g、1 時間遠心し、遠心上清を使用時まで -80 °C で保管した。スクリーニングには、100 TCID<sub>50</sub>/50 µL に希釈したものをを用いた。

PoSaV cowden 株 (オハイオ州立大学 Linda J. Saif 教授らにより分離された株) は、フラスコ内にシート状に培養した LLC-PK 細胞に MOI = 0.01 となるよう接種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2-3 日間培養した後、CPE を観察した。TCID<sub>50</sub> 値は Behrens-Kärber 式

によって算出した。細胞デブリを除去するため、培養上清を  $10,000 \times g$ , 1 時間遠心し、遠心上清を使用時まで  $-80^\circ\text{C}$  で保管した。スクリーニングには、 $500 \text{ TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$  に希釈したものをを用いた。

### CPE-based スクリーニング

$50 \mu\text{M}$  化合物溶液 ( $120 \mu\text{L}$ ) および  $100 \text{ TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$  のウイルス液 ( $120 \mu\text{L}$ ) を 96 穴プレート中で混和し、 $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  インキュベーター内で 30 分間静置した。化合物溶液は、 $10 \text{ mM DMSO}$  溶液を維持培地で希釈して調製した。反応液  $100 \mu\text{L}$  を 96 穴プレートにシート状に培養した細胞へ接種し、 $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  インキュベーター内で 1 時間静置した (inoculation step)。細胞上清を除去し、 $100 \mu\text{L}/\text{well}$  の維持培地を添加して 3–7 日間培養した (growth step)。ただし、PoSaV を用いたアッセイでは、 $500 \text{ TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$  のウイルス液を用い、inoculation step 後の維持培地への置換は、PoSaV の感染、増殖に必須である胆汁酸 (glycochenodeoxycholic acid : GCDCA) ( $50 \mu\text{M}$ , シグマ-アルドリッチ社製) を添加した維持培地を  $150 \mu\text{L}/\text{well}$  使用した<sup>54)</sup>。化合物非処理のウイルスを接種したウェルに CPE が観察された段階で全ウェルを観察し、CPE を阻止した化合物をヒット化合物とした。ヒット化合物については、ウイルス感作時の終濃度が  $6.3\text{--}100 \mu\text{M}$  となるよう 2 倍段階希釈列を作製し、同様の操作を行うことによって最小有効濃度を算出した。

## 第 2 章に関する実験

### 5-Bromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (1)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid ( $203 \text{ mg}$ ,  $0.98 \text{ mmol}$ )、6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine ( $188 \text{ mg}$ ,  $1.12 \text{ mmol}$ )、DMAP ( $133 \text{ mg}$ ,  $1.09 \text{ mmol}$ ) および EDC·HCl ( $208 \text{ mg}$ ,  $1.08 \text{ mmol}$ ) を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \text{ mL}$ ) に溶解し室温で 4 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣を MeOH で数回洗浄した。得られた固体を MeOH で再結晶し、**1** を淡黄色の粉末として得た ( $67 \text{ mg}$ ,  $19\%$ )。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  8.09 (1H, d,  $J = 3.6$ ), 7.93 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.77 (1H, dd,  $J = 8.8, 4.8$ ), 7.43 (1H, d,  $J = 4.8$ ), 7.32 (1H, dt,  $J = 8.8, 2.4$ ).  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta$  159.8, 158.8, 158.7 (d,  $J = 240.6$ ), 144.5, 138.9, 132.5 (d,  $J = 9.9$ ), 132.3, 132.2, 121.1, 120.1, 114.4 (d,  $J = 24.8$ ), 108.3 (d,  $J = 27.3$ ). ESIMS  $m/z$  357 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>

### *N*-(6-Fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2a)

Thiophene-2-carboxylic acid ( $143 \text{ mg}$ ,  $1.12 \text{ mmol}$ )、6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine ( $207 \text{ mg}$ ,  $1.23 \text{ mmol}$ )、DMAP ( $155 \text{ mg}$ ,  $1.27 \text{ mmol}$ ) および EDC·HCl ( $230 \text{ mg}$ ,  $1.20 \text{ mmol}$ ) を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \text{ mL}$ ) に溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液に  $2 \text{ N HCl aq.}$  を加え、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で抽出した。有機層を水、飽和食塩水の順に洗い硫酸マグネシウムで乾燥して減圧下濃縮した。残渣を  $\text{CHCl}_3$  および MeOH で数回洗浄し、**2a** を白色粉末として得た ( $126 \text{ mg}$ ,  $40\%$ )。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  8.32 (1H, d,  $J = 3.2$ ), 8.03 (1H, d,  $J = 4.8$ ), 7.94 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.79 (1H, dd,  $J = 8.8, 4.8$ ), 7.35–7.28 (2H, m).  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta$  160.6, 158.7 (d,  $J = 240.6$ ), 158.5, 145.1, 136.9, 134.2, 132.7 (d,  $J = 8.2$ ), 131.5, 128.7, 121.4, 114.3 (d,  $J = 24.0$ ), 108.2 (d,  $J = 28.1$ ). ESIMS  $m/z$  279 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>

### 5-Chloro-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2b)

5-Chlorothiophene-2-carboxylic acid (163 mg, 1.00 mmol)、6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol)、DMAP (183 mg, 1.50 mmol) および EDC·HCl (287 mg, 1.50 mmol) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) に溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液に 2 N HCl aq. を加え、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で抽出した。有機層を水、飽和食塩水の順に洗い硫酸マグネシウムで乾燥して減圧下濃縮した。残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH = 10 : 1) により精製したのち、得られた固体を CHCl<sub>3</sub> および MeOH で数回洗浄し、**2b** を白色粉末として得た (136 mg, 43%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.15 (1H, s), 7.93 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.8, 4.8), 7.35-7.30 (2H, m). <sup>13</sup>C NMR δ 159.6, 159.0, 158.7 (d, *J* = 240.5), 145.1, 136.0, 132.6, 131.8, 131.5, 128.8, 121.3 (d, *J* = 24.8), 114.4 (d, *J* = 24.8), 108.3 (d, *J* = 27.3). ESIMS *m/z* 313 [M+H]<sup>+</sup>

### 5-Fluoro-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2c)

5-Fluorothiophene-2-carboxylic acid (146 mg, 1.00 mmol) と 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**2c** を白色粉末として得た (76 mg, 26%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.07 (1H, s), 7.92 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.8, 4.8), 7.32 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.4), 6.97 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6). <sup>13</sup>C NMR δ 169.1 (d, *J* = 293.5), 160.3, 158.7 (d, *J* = 240.6), 158.6, 144.9, 132.6 (d, *J* = 8.3), 129.8 (d, *J* = 4.1), 126.5, 121.1 (d, *J* = 9.1), 114.3 (d, *J* = 24.0), 110.9 (d, *J* = 11.5), 108.3 (d, *J* = 27.3). ESIMS *m/z* 297 [M+H]<sup>+</sup>

### 5-(*tert*-Butyl)-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2d)

5-(*tert*-Butyl)thiophene-2-carboxylic acid (184 mg, 1.00 mmol)、6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (186 mg, 1.10 mmol)、DMAP (183 mg, 1.50 mmol) および EDC·HCl (287 mg, 1.50 mmol) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) に溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液に 2 N HCl aq. および CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を加えて生じた沈殿物を吸引ろ過し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> および MeOH で数回洗浄して **2d** を白色粉末として得た (195 mg, 58%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.14 (1H, d, *J* = 3.6), 7.92 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.8, 4.8), 7.31 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.4), 7.09 (1H, dd, *J* = 3.6, 0.8), 1.39 (9H, s). <sup>13</sup>C NMR δ 165.4, 160.5, 158.7 (d, *J* = 239.7), 158.7, 145.3, 133.3, 132.8 (d, *J* = 9.1), 131.6, 123.8, 121.3 (d, *J* = 9.1), 114.2 (d, *J* = 24.0), 108.2 (d, *J* = 27.2), 34.8, 31.8. ESIMS *m/z* 335 [M+H]<sup>+</sup>

### 4-Chloro-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2e)

4-Chlorothiophene-2-carboxylic acid (163 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**2e** を白色粉末として得た (182 mg, 58%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.26 (1H, s), 8.06 (1H, s), 7.94 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.79 (1H, dd, *J* = 8.8, 4.8), 7.33 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.4). <sup>13</sup>C NMR δ 160.6, 158.8 (d, *J* = 240.6), 158.5, 144.9, 137.5 (d, *J* = 9.1), 132.7, 130.7, 129.1, 124.4, 121.4 (d, *J* = 10.7), 114.5 (d, *J* = 24.8), 108.3 (d, *J* = 26.4). ESIMS *m/z* 313 [M+H]<sup>+</sup>

#### 4-Bromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2f)

4-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol)、6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol)、DMAP (184 mg, 1.51 mmol) および EDC·HCl (290 mg, 1.51 mmol) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) に溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液に 2 N HCl aq. および CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を加えて生じた沈殿物を吸引ろ過し、CHCl<sub>3</sub> および MeOH で数回洗浄して **2f** を白色粉末として得た (150 mg, 42%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.30 (1H, s), 8.15 (1H, s), 7.94 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.79 (1H, dd, *J* = 8.8, 4.8), 7.33 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.4). <sup>13</sup>C NMR δ 159.4, 158.8 (d, *J* = 239.8), 158.5, 145.0, 138.2 (d, *J* = 5.8), 133.1, 132.6 (d, *J* = 9.0), 131.6, 121.4 (d, *J* = 11.5), 114.4 (d, *J* = 24.0), 109.6, 108.3 (d, *J* = 27.2). ESIMS *m/z* 357 [M+H]<sup>+</sup>

#### 3-Fluoro-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2g)

3-Fluorothiophene-2-carboxylic acid (147 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2b** の合成と同様の操作を行うことによって、**2g** を白色粉末として得た (120 mg, 40%)。<sup>1</sup>H NMR δ 7.96 (1H, s), 7.91 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.70 (1H, s), 7.33 (1H, t, *J* = 8.8, 2.4), 7.19 (1H, d, *J* = 4.8). <sup>13</sup>C NMR δ 160.8, 158.8 (d, *J* = 241.4), 157.9 (d, *J* = 271.1), 156.6, 141.7, 131.8, 131.7, 119.9, 118.7 (d, *J* = 25.6), 116.1, 114.5 (d, *J* = 24.8), 108.6 (d, *J* = 26.5). ESIMS *m/z* 297 [M+H]<sup>+</sup>

#### 3-Chloro-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2h)

3-Chlorothiophene-2-carboxylic acid (163 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**2h** を白色粉末として得た (131 mg, 42%)。<sup>1</sup>H NMR δ 7.97 (1H, d, *J* = 4.8), 7.91 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.66 (1H, s), 7.33 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.4), 7.25 (1H, d, *J* = 4.8). <sup>13</sup>C NMR δ 161.4, 158.7 (d, *J* = 239.7), 140.4, 131.3, 131.0, 130.0, 129.8, 128.0, 127.7, 118.9 (d, *J* = 9.0), 114.6 (d, *J* = 24.8), 108.8 (d, *J* = 27.3). ESIMS *m/z* 313 [M+H]<sup>+</sup>

#### 3-Bromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2i)

3-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**2i** を白色粉末として得た (41 mg, 11%)。<sup>1</sup>H NMR δ 7.95 (1H, d, *J* = 5.2), 7.91 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.66 (1H, s), 7.35 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.4), 7.29 (1H, d, *J* = 5.2). <sup>13</sup>C NMR δ 163.0, 158.7 (d, *J* = 239.7), 141.7, 132.8, 132.5, 132.0, 131.5, 130.9, 119.2, 114.6 (d, *J* = 24.8), 113.9, 108.9 (d, *J* = 26.4). ESIMS *m/z* 357 [M+H]<sup>+</sup>

#### 3,5-Dibromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2j)

3,5-Dibromothiophene-2-carboxylic acid (286 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**2j** を淡黄色の粉末として得た (266 mg, 61%)。<sup>1</sup>H NMR δ 7.88 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.56 (1H, s), 7.49 (1H, s), 7.34 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.4). <sup>13</sup>C NMR δ 164.6, 164.0, 158.7 (d, *J* = 248.0), 135.7, 135.4, 134.6 (d, *J* =

11.6), 129.6 (d,  $J = 4.1$ ), 118.2, 116.6 (d,  $J = 11.5$ ), 114.8 (d,  $J = 29.4$ ), 113.6, 109.2 (d,  $J = 28.9$ ). ESIMS  $m/z$  435  $[M+H]^+$

### 3,5-Dichloro-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2k)

3,5-Dichlorothiophene-2-carboxylic acid (197 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**2k** を薄茶色の粉末として得た (192 mg, 55%)。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  8.17 (1H, s), 7.85 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.73 (1H, dd,  $J = 8.8, 4.8$ ), 7.29 (1H, dt,  $J = 8.8, 2.4$ ).  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta$  159.9, 158.8 (d,  $J = 240.6$ ), 142.3, 135.1 (d,  $J = 4.9$ ), 134.6, 132.3 (d,  $J = 6.6$ ), 130.7, 130.3, 124.1, 120.7 (dd,  $J = 15.6, 4.1$ ), 114.5 (dd,  $J = 24.8, 8.0$ ), 108.4 (dd,  $J = 27.2, 8.0$ ). ESIMS  $m/z$  347  $[M+H]^+$

### 4,5-Dibromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2l)

4,5-Dibromothiophene-2-carboxylic acid (287 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**2l** を白色粉末として得た (321 mg, 74%)。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  8.16 (1H, s), 7.86 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.74 (1H, dd,  $J = 8.8, 4.8$ ), 7.29 (1H, dt,  $J = 8.8, 2.4$ ).  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta$  159.1, 158.8 (d,  $J = 236.4$ ), 145.7, 138.5, 133.2, 132.3, 129.8, 121.4, 119.3, 114.7, 114.5 (d,  $J = 24.8$ ), 108.4 (d,  $J = 27.3$ ). ESIMS  $m/z$  435  $[M+H]^+$

### 4,5-Dichloro-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2m)

4,5-Dichlorothiophene-2-carboxylic acid (197 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**2m** を白色粉末として得た (207 mg, 60%)。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  8.18 (1H, s), 7.86 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.73 (1H, dd,  $J = 8.8, 4.8$ ), 7.30 (1H, dt,  $J = 8.8, 2.4$ ).  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta$  159.7, 159.5, 158.6 (d,  $J = 240.6$ ), 142.8, 134.7 (d,  $J = 3.3$ ), 131.9 (d,  $J = 8.3$ ), 130.3, 130.1, 123.8, 120.2 (d,  $J = 7.4$ ), 114.1 (d,  $J = 24.8$ ), 108.0 (d,  $J = 27.2$ ). ESIMS  $m/z$  347  $[M+H]^+$

### 3,4,5-Trichloro-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (2n)

3,4,5-Trichlorothiophene-2-carboxylic acid (232 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**2n** を白色粉末として得た (305 mg, 80%)。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  7.82 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.55 (1H, dd,  $J = 8.8, 4.8$ ), 7.31 (1H, dt,  $J = 8.8, 2.4$ ).  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta$  158.6 (d,  $J = 230.6$ ), 156.4, 143.9, 130.7, 129.1 (d,  $J = 9.0$ ), 128.1, 125.0, 124.1, 116.0, 115.9 (d,  $J = 9.1$ ), 114.6 (d,  $J = 24.7$ ), 109.0 (d,  $J = 27.2$ ). ESIMS  $m/z$  381  $[M+H]^+$

### *N*-(6-Fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)furan-2-carboxamide (2o)

Furan-2-carboxylic acid (112 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (186 mg, 1.11 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**2o** を白色粉末として得た (167 mg, 64%)。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  8.07 (1H, d,  $J = 1.6$ ), 7.93 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.78 (1H, dd,  $J = 8.8, 4.8$ ),

7.75 (1H, d,  $J = 3.6$ ), 7.32 (1H, dt,  $J = 8.8, 2.4$ ), 6.78 (1H, dd,  $J = 3.6, 1.6$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  158.8 (d,  $J = 249.7$ ), 158.2, 156.4, 147.7, 145.4, 145.1 (d,  $J = 5.0$ ), 132.7 (d,  $J = 13.3$ ), 121.4 (d,  $J = 8.2$ ), 117.2, 114.3 (d,  $J = 24.0$ ), 112.4, 108.2 (d,  $J = 27.2$ ). ESIMS  $m/z$  263  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### 5-Chloro-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)furan-2-carboxamide (2p)

5-Chlorofuran-2-carboxylic acid (147 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**2p** を白色粉末として得た (97 mg, 33%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  7.93 (1H, dt,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.79–7.76 (2H, m), 7.32 (1H, ddt,  $J = 8.8, 1.6$ ), 6.84–6.82 (1H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  158.7 (d,  $J = 239.8$ ), 158.3, 155.6, 145.1, 140.0, 132.7, 132.6, 121.3 (d,  $J = 9.5$ ), 119.3, 114.3 (d,  $J = 24.8$ ), 109.9, 108.2 (d,  $J = 27.3$ ). ESIMS  $m/z$  297  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### 5-Bromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)furan-2-carboxamide (2q)

5-Bromofuran-2-carboxylic acid (191 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**2q** を薄茶色の粉末として得た (78 mg, 23%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  7.93 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.79–7.75 (2H, m), 7.32 (1H, dt,  $J = 8.8, 2.4$ ), 6.92 (1H, d,  $J = 4.0$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  158.7 (d,  $J = 239.8$ ), 158.2, 155.5, 147.3, 145.4, 132.7 (d,  $J = 8.3$ ), 127.8, 121.4 (d,  $J = 8.3$ ), 119.4, 114.6, 114.4 (d,  $J = 24.8$ ), 108.2 (d,  $J = 27.3$ ). ESIMS  $m/z$  341  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### *N*-(6-Fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiazole-2-carboxamide (2r)

Thiazole-2-carboxylic acid (129 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (186 mg, 1.11 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**2r** を白色粉末として得た (46 mg, 17%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8.25 (1H, d,  $J = 2.8$ ), 8.19 (1H, d,  $J = 2.8$ ), 7.96 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.82 (1H, dd,  $J = 8.8, 4.8$ ), 7.34 (1H, dt,  $J = 8.8, 2.4$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  160.9, 159.3, 158.9 (d,  $J = 240.5$ ), 157.9, 144.7, 132.9, 132.7 (d,  $J = 8.3$ ), 127.8, 121.6, 114.5 (d,  $J = 24.8$ ), 108.3 (d,  $J = 27.3$ ). ESIMS  $m/z$  280  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### *N*-(6-Fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)benzo[*b*]thiophene-2-carboxamide (2s)

Benzo[*b*]thiophene-2-carboxylic acid (179 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (186 mg, 1.11 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**2s** を白色粉末として得た (139 mg, 42%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8.64 (1H, s), 8.10 (1H, d,  $J = 8.8$ ), 8.03 (1H, d,  $J = 7.2$ ), 7.95 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.81 (1H, dd,  $J = 8.8, 4.8$ ), 7.57–7.48 (2H, m), 7.34 (1H, dt,  $J = 8.8, 2.4$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  161.6, 158.8, 158.7 (d,  $J = 239.8$ ), 144.9, 141.1, 139.0, 137.1 (d,  $J = 4.9$ ), 132.6 (d,  $J = 9.1$ ), 128.5, 127.2, 126.0, 125.3, 122.9, 121.3 (d,  $J = 10.7$ ), 114.4 (d,  $J = 24.8$ ), 108.3 (d,  $J = 26.4$ ). ESIMS  $m/z$  329  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 2-Bromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-3-carboxamide (**2t**)

2-Bromothiophene-3-carboxylic acid (207 mg, 1.10 mmol)、6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (186 mg, 1.11 mmol)、DMAP (183 mg, 1.50 mmol) および EDC·HCl (288 mg, 1.50 mmol) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) に溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液に 2 N HCl aq. を加え、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で抽出した。有機層を水、飽和食塩水の順に洗い硫酸マグネシウムで乾燥して減圧下濃縮した。残渣を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> および MeOH で数回洗浄し、**2t** を白色粉末として得た (72 mg, 20%)。<sup>1</sup>H NMR δ 7.94 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.80 (1H, dd, *J* = 8.8, 4.8), 7.75 (1H, dd, *J* = 6.0, 1.2), 7.61 (1H, dd, *J* = 6.0, 1.2), 7.33 (1H, ddt, *J* = 8.8, 2.4, 0.8)。<sup>13</sup>C NMR δ 161.3, 158.8 (d, *J* = 239.8), 158.2, 145.1 (d, *J* = 10.7), 133.0, 132.7 (d, *J* = 10.7), 128.1, 128.0, 121.6, 117.5, 114.4 (d, *J* = 24.8), 108.2 (d, *J* = 27.2)。ESIMS *m/z* 357 [M+H]<sup>+</sup>

### 4-Bromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-3-carboxamide (**2u**)

4-Bromothiophene-3-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2t** の合成と同様の操作を行うことによって、**2u** を白色粉末として得た (134 mg, 37%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.48 (1H, dd, *J* = 3.6, 1.2), 7.94 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.86 (1H, dd, *J* = 3.6, 1.2), 7.80 (1H, dd, *J* = 8.8, 4.8), 7.33 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.4)。<sup>13</sup>C NMR δ 161.2, 158.7 (d, *J* = 239.7), 158.2, 145.1, 132.9, 132.8, 132.7 (d, *J* = 10.7), 126.5, 121.6 (d, *J* = 9.1), 114.3 (d, *J* = 24.8), 109.0, 108.2 (d, *J* = 26.4)。ESIMS *m/z* 357 [M+H]<sup>+</sup>

### 5-Bromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-3-carboxamide (**2v**)

5-Bromothiophene-3-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (186 mg, 1.11 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**2v** を白色粉末として得た (278 mg, 78%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.64 (1H, d, *J* = 1.6), 7.93 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.87 (1H, d, *J* = 1.6), 7.79 (1H, dd, *J* = 8.8, 4.8), 7.32 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.4)。<sup>13</sup>C NMR δ 159.9, 158.7 (d, *J* = 239.8), 158.4, 145.2, 135.1, 134.6, 132.8 (d, *J* = 11.5), 129.8, 121.5 (d, *J* = 9.1), 114.3 (d, *J* = 24.8), 112.8, 108.2 (d, *J* = 27.2)。ESIMS *m/z* 357 [M+H]<sup>+</sup>

### 2,5-Dibromo-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-3-carboxamide (**2w**)

2,5-Dibromothiophene-3-carboxylic acid (286 mg, 1.00 mmol) および 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (185 mg, 1.10 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**2w** を白色粉末として得た (313 mg, 72%)。<sup>1</sup>H NMR δ 7.94 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4), 7.82–7.78 (2H, m), 7.33 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.4)。<sup>13</sup>C NMR δ 160.2, 158.8 (d, *J* = 239.7), 158.1, 144.7, 134.2, 132.7 (d, *J* = 11.5), 131.1, 121.6 (d, *J* = 9.8), 117.0, 114.4 (d, *J* = 24.8), 111.3, 108.2 (d, *J* = 27.2)。ESIMS *m/z* 435 [M+H]<sup>+</sup>

### *N*-(Benzo[*d*]thiazol-2-yl)-5-bromothiophene-2-carboxamide (**3a**)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol)、benzo[*d*]thiazol-2-amine (166 mg, 1.10 mmol)、DMAP (183 mg, 1.50 mmol) および EDC·HCl (288 mg, 1.50 mmol) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) に溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液に 2 N HCl aq. および CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を加えて生じた沈殿物

を吸引ろ過し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> および MeOH で数回洗浄した。得られた固体を NH-シリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH = 4 : 1 to 10 : 3) により精製し、**3a** を白色粉末として得た (106 mg, 31%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.06 (1H, s), 8.00 (1H, d, *J* = 8.0), 7.74 (1H, d, *J* = 8.0), 7.47 (1H, dt, *J* = 8.4, 1.6), 7.43 (1H, d, *J* = 3.6), 7.34 (1H, dt, *J* = 8.4, 1.6)。<sup>13</sup>C NMR δ 160.7, 160.3, 152.3, 139.5, 132.2, 132.1, 131.2, 130.8, 126.4, 123.7, 121.9, 119.9。ESIMS *m/z* 339 [M+H]<sup>+</sup>

#### **5-Bromo-*N*-(6-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3b)**

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (205 mg, 0.99 mmol) および 6-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (202 mg, 1.10 mmol) から、**1** の合成と同様の操作を行うことによって、**3b** を淡黄色の粉末として得た (143 mg, 38%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.15 (1H, d, *J* = 1.6), 8.09 (1H, d, *J* = 3.6), 7.74 (1H, d, *J* = 8.4), 7.48 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.6), 7.43 (1H, d, *J* = 3.6)。<sup>13</sup>C NMR δ 159.9, 158.4, 150.4, 138.9, 132.9, 132.4, 132.3, 127.8, 126.6, 121.5, 121.1, 120.3。ESIMS *m/z* 373 [M+H]<sup>+</sup>

#### **5-Bromo-*N*-(6-bromobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3c)**

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (209 mg, 1.01 mmol) および 6-bromobenzo[*d*]thiazol-2-amine (256 mg, 1.10 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**3c** を白色粉末として得た (40 mg, 10%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.28 (1H, d, *J* = 1.6), 8.09 (1H, s), 7.69 (1H, d, *J* = 8.0), 7.60 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.6), 7.43 (1H, d, *J* = 3.6)。<sup>13</sup>C NMR δ 159.8, 147.8, 138.9, 133.4, 132.3, 129.6, 129.3, 124.3, 121.8, 121.6, 120.3, 115.7。ESIMS *m/z* 417 [M+H]<sup>+</sup>

#### **5-Bromo-*N*-(5-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3d)**

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (206 mg, 1.00 mmol) および 5-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (191 mg, 1.10 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**3d** を白色粉末として得た (30 mg, 8%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.11 (1H, s), 8.04 (1H, dd, *J* = 8.8, 5.6), 7.59 (1H, d, *J* = 9.6), 7.44 (1H, d, *J* = 3.6), 7.23 (1H, dt, *J* = 8.8, 2.4)。<sup>13</sup>C NMR δ 161.4 (d, *J* = 239.7), 161.0, 159.4, 148.7, 138.9 (d, *J* = 6.6), 132.6, 132.3, 127.1 (d, *J* = 4.1), 123.2 (d, *J* = 9.9), 120.3, 111.8 (d, *J* = 24.0), 106.3。ESIMS *m/z* 357 [M+H]<sup>+</sup>

#### **5-Bromo-*N*-(5-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3e)**

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 5-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (203 mg, 1.10 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**3e** を白色粉末として得た (214 mg, 57%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.10 (1H, s), 8.04 (1H, d, *J* = 8.8), 7.81 (1H, s), 7.43 (1H, d, *J* = 3.6), 7.37 (1H, dd, *J* = 8.8, 1.6)。<sup>13</sup>C NMR δ 160.8, 159.8, 149.0, 138.8, 132.3, 132.2, 130.9, 130.1, 123.7, 123.4, 120.3, 119.5。ESIMS *m/z* 373 [M+H]<sup>+</sup>

#### **5-Bromo-*N*-(5-bromobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3f)**

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 5-bromobenzo[*d*]thiazol-2-amine (252 mg, 1.10 mmol) から、**2f** の合成と同様の操作を行うことによって、**3f** を白色粉末として

得た (220 mg, 53%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.10 (1H, d, *J* = 3.6), 7.98 (1H, d, *J* = 8.4), 7.95 (1H, s), 7.49 (1H, ddd, *J* = 8.4, 1.6, 0.8), 7.43 (1H, d, *J* = 3.6)。<sup>13</sup>C NMR δ 160.3, 159.9, 149.4, 138.8, 132.4, 132.3, 130.5, 126.4, 123.7, 122.4, 120.4, 119.0。ESIMS *m/z* 417 [M+H]<sup>+</sup>

#### 5-Bromo -*N*-(4-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3g)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (212 mg, 1.02 mmol)および 4-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (186 mg, 1.11 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**3g** を白色粉末として得た (52.4 mg, 15%)。<sup>1</sup>H NMR δ 10.42 (1H, s), 7.88 (1H, d, *J* = 3.6), 7.78 (1H, t, *J* = 8.4), 7.73 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.6), 7.53 (1H, m), 7.39 (1H, d, *J* = 3.6)。<sup>13</sup>C NMR δ 158.9, 155.1 (d, *J* = 252.1), 140.3, 131.9, 130.8, 128.0, 126.9 (d, *J* = 4.2), 126.6 (d, *J* = 12.4), 122.2 (d, *J* = 8.3), 118.5 (d, *J* = 2.5), 118.3, 111.3。ESIMS *m/z* 357 [M+H]<sup>+</sup>

#### 5-Bromo -*N*-(4-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3h)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol)および 4-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (204 mg, 1.10 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**3h** を白色粉末として得た (132 mg, 35%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.21 (1H, d, *J* = 4.0), 8.00 (1H, d, *J* = 8.0), 7.55 (1H, d, *J* = 8.0), 7.44 (1H, dd, *J* = 4.0, 0.4), 7.33 (1H, dt, *J* = 8.4, 0.4)。<sup>13</sup>C NMR δ 159.4, 159.3, 145.4, 138.4, 133.3, 132.6, 132.4, 129.3, 124.6, 124.4, 120.8, 120.6。ESIMS *m/z* 373 [M+H]<sup>+</sup>

#### 5-Bromo -*N*-(4-bromobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3i)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol)および 4-bromobenzo[*d*]thiazol-2-amine (253 mg, 1.10 mmol) から、**2t** の合成と同様の操作を行うことによって、**3i** を白色粉末として得た (257 mg, 61%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.22 (1H, d, *J* = 4.0), 8.03 (1H, d, *J* = 8.0), 7.70 (1H, d, *J* = 8.0), 7.44 (1H, d, *J* = 4.0), 7.26 (1H, t, *J* = 8.4)。<sup>13</sup>C NMR δ 159.5, 159.1, 146.7, 138.4, 132.7, 132.6, 132.4, 129.4, 125.0, 121.3, 120.6, 113.6。ESIMS *m/z* 417 [M+H]<sup>+</sup>

#### 5-Bromo -*N*-(4,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3j)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (212 mg, 1.02 mmol)および 4,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (205 mg, 1.11 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**3j** を白色粉末として得た (95 mg, 25%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.11 (1H, d, *J* = 4.0), 7.76 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.6), 7.40 (1H, d, *J* = 4.0), 7.31 (1H, dt, *J* = 10.4, 2.4)。<sup>13</sup>C NMR δ 158.5, 158.4, 157.9 (dd, *J* = 243.2, 10.7), 153.1 (dd, *J* = 254.2, 12.8), 138.1 (d, *J* = 9.9), 134.7 (dd, *J* = 11.9, 6.6), 133.6 (d, *J* = 8.2), 132.2, 131.9, 120.0 (d, *J* = 5.8), 104.0 (dd, *J* = 26.5, 4.2), 101.6 (dd, *J* = 28.9, 22.4)。ESIMS *m/z* 375 [M+H]<sup>+</sup>

#### 5-Bromo-*N*-(4,6-dichlorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3k)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 4,6-dichlorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (241 mg, 1.10 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**3k** を淡黄色の粉末として得た (276 mg, 68%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.19 (1H, d, *J* = 4.0), 8.16 (1H, d, *J* = 1.6), 7.67 (1H,

d,  $J = 1.6$ ), 7.44 (1H, d,  $J = 4.0$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  160.2, 159.6, 144.6, 138.3, 134.3, 132.7, 132.4, 127.7, 126.1, 125.0, 120.8, 120.6. ESIMS  $m/z$  409  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 5-Bromo-*N*-(4-bromo-6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3l)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 4-bromo-6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (272 mg, 1.10 mmol) から、**3a** の合成と同様の操作を行うことによって、**3l** を淡黄色の粉末として得た (303 mg, 69%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8.32 (1H, s), 8.20 (1H, d,  $J = 4.0$ ), 8.00 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.69 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 7.44 (1H, d,  $J = 4.0$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  159.5, 159.0, 158.0 (d,  $J = 243.9$ ), 143.8, 138.3, 133.2 (d,  $J = 11.5$ ), 132.6, 132.3, 120.6, 117.7 (d,  $J = 28.1$ ), 113.5 (d,  $J = 10.7$ ), 107.9 (d,  $J = 26.4$ ). ESIMS  $m/z$  435  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 5-Bromo-*N*-(5,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3m)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.02 mmol) および 5,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (205 mg, 1.11 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**3m** を白色粉末として得た (210 mg, 56%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8.16 (1H, t,  $J = 8.0$ ), 8.11 (1H, d,  $J = 4.0$ ), 7.84 (1H, dd,  $J = 11.2, 7.2$ ), 7.43 (1H, dd,  $J = 4.0, 1.6$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  160.3, 159.4, 149.2 (dd,  $J = 242.7, 14.5$ ), 147.0 (dd,  $J = 242.7, 14.5$ ), 138.5, 132.4, 132.3, 132.2, 127.2 (d,  $J = 6.6$ ), 120.5, 110.0 (dd,  $J = 23.0, 5.8$ ), 108.3 (d,  $J = 13.3$ ). ESIMS  $m/z$  375  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 5-Bromo-*N*-(6-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3n)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 6-methylbenzo[*d*]thiazol-2-amine (180 mg, 1.10 mmol) から、**3a** の合成と同様の操作を行うことによって、**3n** を白色粉末として得た (92 mg, 26%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8.04 (1H, s), 7.78 (1H, s), 7.62 (1H, d,  $J = 8.0$ ), 7.41 (1H, d,  $J = 4.0$ ), 7.28 (1H, d,  $J = 8.0$ ), 2.42 (3H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  162.6, 159.4, 139.7, 139.6, 133.2, 132.2, 131.9, 131.1, 127.6, 121.5, 119.7, 119.3, 21.0. ESIMS  $m/z$  353  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 5-Bromo-*N*-(4-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3o)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 4-methylbenzo[*d*]thiazol-2-amine (181 mg, 1.10 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**3o** を淡黄色の粉末として得た (159 mg, 45%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8.17 (1H, s), 7.81 (1H, d,  $J = 8.0$ ), 7.43 (1H, d,  $J = 4.0$ ), 7.29–7.21 (2H, m), 2.62 (3H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  159.2, 157.3, 147.7, 138.8, 132.3, 132.1, 131.3, 129.9, 126.8, 123.7, 120.2, 119.1, 18.1. ESIMS  $m/z$  353  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 5-Bromo-*N*-(5,6-dimethylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3p)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 5,6-dimethylbenzo[*d*]thiazol-2-amine (196 mg, 1.10 mmol) から、**3a** の合成と同様の操作を行うことによって、**3p** を薄茶色の粉末として得た (121 mg, 33%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8.02 (1H, s), 7.72 (1H, s), 7.52 (1H, s), 7.41 (1H, d,  $J = 4.0$ ), 2.33 (3H, s), 2.32 (3H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  160.2, 159.5, 139.7, 139.2, 135.1, 132.6, 132.2, 131.8,

128.2, 128.0, 121.7, 119.6, 19.7, 19.5. ESIMS  $m/z$  367  $[M+H]^+$

### 5-Bromo -*N*-(6-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3q)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (208 mg, 1.01 mmol) および 6-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-amine (205 mg, 1.14 mmol) から、**1** の合成と同様の操作を行うことによって、**3q** を淡黄色の粉末として得た (143 mg, 39%)。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  8.06 (1H, s), 7.64 (1H, d,  $J = 8.8$ ), 7.60 (1H, d,  $J = 2.4$ ), 7.42 (1H, d,  $J = 4.0$ ), 7.06 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 3.82 (3H, s).  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta$  160.9, 156.7, 156.3, 139.4, 132.4, 132.2, 131.9, 120.7, 120.4, 119.8, 115.1, 104.9, 55.6. ESIMS  $m/z$  369  $[M+H]^+$

### 5-Bromo -*N*-(4-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3r)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 4-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-amine (198 mg, 1.10 mmol) から、**3a** の合成と同様の操作を行うことによって、**3r** を白色粉末として得た (170 mg, 46%)。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  8.12 (1H, s), 7.55 (1H, d,  $J = 8.0$ ), 7.43 (1H, d,  $J = 4.0$ ), 7.29 (1H, t,  $J = 8.0$ ), 7.02 (1H, d,  $J = 8.0$ ), 3.93 (3H, s).  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta$  159.1, 156.6, 151.9, 138.8, 138.4, 132.9, 132.3, 132.0, 124.8, 120.1, 113.4, 107.6, 55.7. ESIMS  $m/z$  369  $[M+H]^+$

### 5-Bromo -*N*-(6-ethoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3s)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 6-ethoxybenzo[*d*]thiazol-2-amine (214 mg, 1.10 mmol) から、**2b** の合成と同様の操作を行うことによって、**3s** を白色粉末として得た (163 mg, 43%)。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  8.06 (1H, s), 7.63 (1H, d,  $J = 8.4$ ), 7.58 (1H, d,  $J = 2.4$ ), 7.42 (1H, d,  $J = 4.0$ ), 7.05 (1H, ddd,  $J = 8.4, 2.4, 0.8$ ), 4.08 (2H, q,  $J = 2.8$ ), 1.36 (3H, t,  $J = 2.8$ ).  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta$  159.5, 156.7, 155.5, 142.4, 139.4, 132.5, 132.2, 131.9, 120.6, 119.8, 115.5, 105.5, 63.6, 14.7. ESIMS  $m/z$  383  $[M+H]^+$

### 5-Bromo -*N*-(6-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3t)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 6-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-amine (215 mg, 1.10 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**3t** を黄色の粉末として得た (339 mg, 88%)。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  8.99 (1H, d,  $J = 2.4$ ), 8.28 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$ ), 8.09 (1H, d,  $J = 4.0$ ), 7.88 (1H, d,  $J = 8.8$ ), 7.40 (1H, d,  $J = 4.0$ ).  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta$  164.0, 160.1, 152.1, 143.0, 138.3, 132.5, 131.9, 131.7, 121.5, 120.2, 119.6, 118.6. ESIMS  $m/z$  382  $[M-H]^-$

### 5-Bromo-*N*-(6-(trifluoromethyl)benzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3u)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (208 mg, 1.00 mmol)、6-(trifluoromethyl)benzo[*d*]thiazol-2-amine (241 mg, 1.10 mmol)、DMAP (184 mg, 1.50 mmol) および EDC·HCl (288 mg, 1.50 mmol) を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) に溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液に 2 N HCl aq. および  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  を加えて生じた沈殿物を吸引ろ過し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  および MeOH で数回洗浄した。得られた固体を分取用薄層クロマトグラフィー (eluent:  $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 30 : 1$ ) により精製し、**3u** を白色粉末として得た (184 mg, 70%)。 $^1\text{H NMR}$   $\delta$  8.51 (1H, s), 8.12 (1H, s), 7.92 (1H, d,  $J = 8.0$ ), 7.77 (1H,

dd,  $J = 8.0, 1.6$ ), 7.44 (1H, d,  $J = 4.0$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  165.2, 138.7, 132.7, 132.5, 132.4, 131.9, 128.6, 125.9, 123.9 (q,  $J = 32.2$ ), 123.2 (d,  $J = 4.1$ ), 120.6, 120.4, 120.3 (d,  $J = 4.1$ ). ESIMS  $m/z$  407  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### 5-Bromo-*N*-(6-(trifluoromethoxy)benzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3v)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 6-(trifluoromethoxy)benzo[*d*]thiazol-2-amine (258 mg, 1.10 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**3v** を白色粉末として得た (22 mg, 5%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8.15 (1H, d,  $J = 2.4$ ), 8.11 (1H, d,  $J = 3.2$ ), 7.84 (1H, dt,  $J = 8.8$ ), 7.47–7.43 (2H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  160.3, 160.0, 144.9, 144.2, 138.8 (d,  $J = 6.6$ ), 132.5 (d,  $J = 5.7$ ), 132.4, 132.3, 121.1, 120.3, 120.2 (q,  $J = 256.2$ ), 120.0, 115.1. ESIMS  $m/z$  423  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### Ethyl 2-(5-bromothiophene-2-carboxamido)benzo[*d*]thiazole-6-carboxylate (3w)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および ethyl 2-aminobenzo[*d*]thiazole-6-carboxylate (244 mg, 1.10 mmol) から、**2a** の合成と同様の操作を行うことによって、**3w** を白色粉末として得た (184 mg, 45%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8.65 (1H, s), 8.10 (1H, s), 8.03 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.6$ ), 7.82 (1H, d,  $J = 8.0$ ), 7.43 (1H, d,  $J = 4.0$ ), 4.35 (2H, q,  $J = 3.2$ ), 1.36 (3H, t,  $J = 3.2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  165.4, 159.8, 138.8, 138.7, 132.4, 132.3, 131.3, 127.2, 125.0, 123.9, 120.5, 120.4, 119.7, 60.7, 14.2. ESIMS  $m/z$  411  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### 5-Bromo-*N*-(6-(*tert*-butyl)benzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (3x)

5-Bromothiophene-2-carboxylic acid (207 mg, 1.00 mmol) および 6-(*tert*-butyl)benzo[*d*]thiazol-2-amine (227 mg, 1.10 mmol)、DMAP (184 mg, 1.50 mmol) および EDC·HCl (289 mg, 1.51 mmol) を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) に溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液に 2 N HCl aq. および  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  を加えて生じた沈殿物を吸引ろ過し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  および MeOH で数回洗浄した。得られた固体を分取用薄層クロマトグラフィー (eluent :  $\text{CHCl}_3$  / MeOH = 40 : 1) により精製し、**3x** を淡黄色の粉末として得た (225 mg, 57%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8.05 (1H, s), 8.00 (1H, s), 7.64 (1H, s), 7.52 (1H, d,  $J = 8.8$ ), 7.42 (1H, d,  $J = 3.6$ ), 1.35 (9H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  160.4, 159.7, 147.0, 146.7, 139.5, 132.2, 131.9, 131.0, 124.1, 119.8, 119.1, 118.0, 34.7, 31.4. ESIMS  $m/z$  395  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### 5-Chloro-*N*-(4,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (4a)

5-Chlorothiophene-2-carboxylic acid (163 mg, 1.00 mmol) および 4,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (205 mg, 1.10 mmol) から、**2f** の合成と同様の操作を行うことによって、**4a** を白色粉末として得た (192 mg, 58%)。 $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8.21 (1H, d,  $J = 4.0$ ), 7.83 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.4$ ), 7.40 (1H, dt,  $J = 10.2, 2.4$ ), 7.35 (1H, d,  $J = 4.0$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  158.6, 158.2 (dd,  $J = 242.2, 9.8$ ), 153.3 (d,  $J = 250.4, 15.4$ ), 136.5, 135.5, 134.9 (dd,  $J = 13.3, 4.1$ ), 133.9 (dd,  $J = 13.3, 4.1$ ), 133.8, 131.8, 129.0, 104.5 (dd,  $J = 26.4, 4.1$ ), 102.4 (dd,  $J = 28.9, 22.3$ ). ESIMS  $m/z$  331  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### 3,5-Dibromo-*N*-(4,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (4b)

3,5-Dibromothiophene-2-carboxylic acid (286 mg, 1.00 mmol) および 4,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-

2-amine (204 mg, 1.10 mmol) から、**2f** の合成と同様の操作を行うことによって、**4b** を白色粉末として得た (270 mg, 60%)。<sup>1</sup>H NMR δ 7.83 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0), 7.56 (1H, s), 7.43 (1H, dt, *J* = 10.2, 2.0). <sup>13</sup>C NMR δ 159.7, 159.0, 158.3 (dd, *J* = 242.2, 10.7), 152.7 (dd, *J* = 241.2, 20.7), 135.2, 134.9, 134.3 (d, *J* = 10.7), 131.4 (d, *J* = 7.4), 118.4, 114.3, 104.7 (dd, *J* = 26.4, 3.3), 102.2 (dd, *J* = 28.0, 23.1). ESIMS *m/z* 453 [M+H]<sup>+</sup>

### 3,5-Dichloro-*N*-(4,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (**4c**)

3,5-Dichlorothiophene-2-carboxylic acid (197 mg, 1.00 mmol)、4,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (205 mg, 1.10 mmol)、DMAP (184 mg, 1.51 mmol) および EDC·HCl (289 mg, 1.51 mmol) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) に溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液に 2 N HCl aq. および CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を加えて生じた沈殿物を吸引ろ過し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> および MeOH で数回洗浄した。得られた固体を NH-シリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluent : CHCl<sub>3</sub> / MeOH = 20 : 1 to 4 : 1) により精製し、**4c** を白色粉末として得た (165 mg, 45%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.26 (1H, s), 7.75 (1H, ddd, *J* = 8.8, 2.4, 1.2), 7.29 (1H, dt, *J* = 10.2, 2.4). <sup>13</sup>C NMR δ 158.6, 158.3, 158.0 (dd, *J* = 243.0, 10.7), 153.0 (dd, *J* = 254.6, 14.1), 134.7 (dd, *J* = 12.4, 4.2), 133.7, 133.5 (dd, *J* = 12.4, 4.2), 130.8, 130.4, 123.8, 103.9 (dd, *J* = 26.4, 4.9), 101.5 (dd, *J* = 28.1, 21.5). ESIMS *m/z* 365 [M+H]<sup>+</sup>

### 4,5-Dichloro-*N*-(4,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)thiophene-2-carboxamide (**4d**)

4,5-Dichlorothiophene-2-carboxylic acid (198 mg, 1.00 mmol) および 4,6-difluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (205 mg, 1.10 mmol) から、**2d** の合成と同様の操作を行うことによって、**4d** を白色粉末として得た (268 mg, 73%)。<sup>1</sup>H NMR δ 8.26 (1H, s), 7.75 (1H, d, *J* = 8.0), 7.29 (1H, t, *J* = 10.2). <sup>13</sup>C NMR δ 158.6, 158.3, 158.0 (dd, *J* = 243.0, 10.7), 153.1 (dd, *J* = 253.7, 13.3), 134.7 (dd, *J* = 13.3, 4.9), 133.6, 133.4 (dd, *J* = 13.3, 4.9), 130.9, 130.4, 123.8, 104.0 (dd, *J* = 26.5, 4.9), 101.6 (dd, *J* = 28.9, 22.3). ESIMS *m/z* 365 [M+H]<sup>+</sup>

## 細胞およびウイルス

RAW264.7 細胞および MNV の培養法は、第 1 章に関する実験に記載した方法に従った。

### 複素環カルボキサミド類縁体の抗 MNV 活性の評価

FBS 不含 DMEM 培地を用い、化合物の段階希釈列を作製した (0.012–200 μM)。各濃度の化合物溶液 (60 μL) および 280 TCID<sub>50</sub>/50 μL の MNV 液 (60 μL) を 96 穴プレート中で混合し、37 °C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分間静置した。反応液 100 μL を 96 穴プレートにシート状に培養した RAW264.7 細胞へ接種し、37 °C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間静置した。細胞上清を除去し、Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS、日水製薬社製) で 1 回洗浄した後、FBS を 2% 添加した培地を 100 μL/well 添加して 3 日間培養した。化合物非処理のウイルスを接種したウェルに CPE が生じたことを確認した後、培養上清を除去し、フェノールレッド不含 DMEM 培地 70 μL/well を加え、同じ培地で 3 倍に希釈した water-soluble tetrazolium salt (WST)-8 (同仁化学社製) を 30 μL/well 添加した。37 °C, 5%

CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間静置した後、プレートリーダー (サーモサイエンティフィック社製) にて 450 nm における吸光度を測定した。2 回繰り返して試験したデータに対して、各濃度の化合物における細胞生存率を以下の式によって算出し、EC<sub>50</sub> 値 (生細胞数を 50% レスキューする化合物濃度) を求めた。

$$\text{Cell viability (\%)} = [(\text{OD}_{\text{treated}})_{\text{MNV}} - \text{OD}_{\text{VC}}] / [\text{OD}_{\text{CC}} - \text{OD}_{\text{VC}}] \times 100$$

OD<sub>CC</sub>: ウイルス非感染、化合物非処理の条件で培養した細胞における吸光度

OD<sub>VC</sub>: ウイルス感染、化合物非処理の条件で培養した細胞における吸光度

(OD<sub>treated</sub>)<sub>MNV</sub>: ウイルス感染、化合物処理の条件で培養した細胞における吸光度

Time-of-addition アッセイでは、140 TCID<sub>50</sub>/50 μL のマウスノロウイルス液 (100 μL) を 96 穴プレートにシート状に培養した RAW264.7 細胞へ接種し、37 °C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間静置した後、ウイルス液を除去し、DPBS で 1 回洗浄した。FBS 不含 DMEM 培地を用いて作製した化合物 (4b, 2'-CMC, GC376 およびタンニン酸) の段階希釈列 (0.0061 – 100 μM) を 100 μL/well ずつ細胞に添加し、37 °C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 日間培養した。EC<sub>50</sub> 値の算出は、上述の方法に従った。

#### 細胞増殖阻害試験

上述した系において、ウイルスを添加することなく試験を行い、化合物の細胞増殖阻害を評価した (CC<sub>50</sub> (1 h))。また、3–100 μM に調製した化合物段階希釈列について、細胞を 72 時間処理した際の細胞増殖阻害を評価した (CC<sub>50</sub> (72 h))。WST-8 を用いて CPE reduction アッセイと同様の手法で吸光度を測定し、細胞生存率を以下の式によって算出して CC<sub>50</sub> 値 (生細胞数が 50% となる化合物濃度) を求めた。

$$\text{Cell viability (\%)} = \text{OD}_{\text{treated}} / \text{OD}_{\text{CC}} \times 100$$

OD<sub>CC</sub>: 化合物非処理の条件で培養した細胞における吸光度

OD<sub>treated</sub>: 化合物処理の条件で培養した細胞における吸光度

#### 遠心式フィルターを用いた TCID<sub>50</sub> アッセイ

225 μM の化合物溶液 (4b, 2'-CMC, GC376 およびタンニン酸) および MNV 液 (3150 TCID<sub>50</sub>) の混合液を遠心フィルター付きチューブ (Amicon Ultra-0.5 (100 K)、メルクミリポア社製) 内で混合し、室温下静置した。1 時間後、FBS 不含 DMEM 培地 450 μL を加え、20,000 × g, 1 分間遠心し、再び FBS 不含 DMEM 培地 450 μL を加え、20,000 × g, 1 分間遠心した。ウイルスはチューブのマニュアルに記載の手法に基づいて回収し、FBS 不含 DMEM 培地にて 5 倍段階希釈列を作製した。各希釈液を 96 ウェルプレートに播種した RAW264.7 細胞に接種した。3 日後、CPE を観察し、Behrens-Kärber 式によって TCID<sub>50</sub> 値を算出した。試

験は 2 回繰り返して行った。

### ***In vitro* transcription/translation アッセイ (プロテアーゼ活性阻害の検討)**

#### **鋳型 DNA の作製**

MNV S7 株 (Genbank accession number; AB435515) のゲノム全長 cDNA をクローニングしたプラスミド (野生型もしくはプロテアーゼの活性を消失させるために GDCG 配列中のシステイン残基をアラニンに置換した変異型) から、ORF1 部分に相当する PCR 産物をそれぞれ得た。すなわち、10  $\mu$ M 各プライマー、10  $\times$  Buffer for KOD-Plus- DNA polymerase (10  $\mu$ L), 2 mM dNTPs (10  $\mu$ L), 25 mM MgSO<sub>4</sub> (4  $\mu$ L), KOD-Plus- DNA polymerase (1.0 U/ $\mu$ L) (2  $\mu$ L) (東洋紡社製) を含む反応液 99  $\mu$ L に、100 ng/ $\mu$ L の野生型もしくは変異型プラスミド (1  $\mu$ L) を加えた。サーマルサイクラー (アプライドバイオシステムズ社製) を使用し、94  $^{\circ}$ C, 10 分間、37  $^{\circ}$ C, 30 秒間処理後、94  $^{\circ}$ C, 30 秒間、58  $^{\circ}$ C, 30 秒間、68  $^{\circ}$ C, 7 分間を 35 サイクル行い、68  $^{\circ}$ C, 15 分間処理した。プライマーは、MNV3 TNT ORF1-S (5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAACAGCCACCATGAGGATGGCAACGCCATCTTC TGCG-3') および MNV3 TNT ORF1-A (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTCATCCTCATTACAAAAGACTGCTG-3') を使用した。

#### ***In vitro* transcription/translation 反応**

TNT T7 Quick for PCR DNA system (プロメガ社製) を用い、*in vitro* transcription/translation を行った。すなわち、上述の野生型もしくは変異型 ORF1 ポリプロテインを発現させるための鋳型 DNA を含む PCR 反応液 (5  $\mu$ L) を、TNT T7 PCR Quick Master Mix (プロメガ社製) (40  $\mu$ L)、Easy Tag<sup>TM</sup> L-[<sup>35</sup>S]-Methionine (2  $\mu$ L) (パーキンエルマー社製) と混合後、10 mM 化合物溶液 (4b, 2i (不活性類縁体), 2'-CMC, GC376) (3  $\mu$ L) を添加し、30  $^{\circ}$ C, 90 分間反応させた。各反応液 4  $\mu$ L を採取し、sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% (w/v) sucrose, 2% (w/v) SDS, 0.002% (w/v) bromophenol blue, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol 含有) (20  $\mu$ L) と混和し 95  $^{\circ}$ C, 5 分間加熱した。この混合液 10  $\mu$ L を用い、5%–20% Tris-Gly polyacrylamide gel (ディー・アール・シー社製) で SDS-PAGE を行った。ゲル中の泳動タンパクをセミドライ式ブロッティング装置 (アトー社製) で PVDF 膜 (Immobilon-P、メルクミリポア社製) に転写後、radioisotope (RI) シグナルを Typhoon FLA 7000 (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) でスキャンし、画像データを取得した。

MNV プロテアーゼは、ORF1 ポリプロテインの一部としてコードされている。野生型 ORF1 ポリプロテインは翻訳と同時にウイルスプロテアーゼによって複数箇所の切断が起こる (DMSO 処理の結果参照)。化合物がウイルスプロテアーゼを完全に阻害した場合はこの切断が起こらず、部分的に阻害した場合は切断が不完全となり、ORF1 ポリプロテインの切断産物パターンに変化が起きると考えられる。プロテアーゼ活性を消失させた変異型 ORF1 ポリプロテインは、ORF1 ポリプロテイン全長産物の大きさを示すとともに、DMSO や各化合

物が翻訳反応そのものを阻害していないことを示すためのコントロールとするために発現させた。

### 第 3 章に関する実験

#### 細胞培養

CRFK 細胞および RAW264.7 細胞の培養法は、第 1 章に関する実験に記載した方法に従った。

WI-38 細胞 (ATCC cat. code; CCL-75) および MRC-5 細胞 (ATCC cat. code; CCL-171) は、DMEM (和光純薬社製、15 mg/L フェノールレッド、4500 mg/L グルコース、4 mM L-グルタミン添加) に、抗生物質 (50 U/mL ペニシリン、50 µg/mL ストレプトマイシン、ライフテクノロジーズ社製)、非働化した 10% FBS (ニッスイバイオサイエンス社製) を添加した培地を用いて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で継代培養した。細胞毒性の評価には、 $2.5 \times 10^3$  cells/well の割合で 96 ウェルプレートに播種し、24 時間培養したものをを用いた。

#### ウイルス調製

MNV の培養法は、第 1 章に関する実験に記載した方法に従った。

FCV F-9 株 (ATCC cat. code; VR-782) は、フラスコ内にシート状に培養した CRFK 細胞に MOI = 0.01 となるよう接種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で2-3日間培養した後、CPE を観察した。TCID<sub>50</sub> 値は Behrens-Kärber 式によって算出した。細胞デブリを除去するため、培養上清を10,000 × g、1 時間遠心し、遠心上清を使用時まで -80 °C で保管した。

ヒトノロウイルスは、静岡県環境衛生科学研究所において -20 °Cで保管されているヒトノロウイルス (GII.4) 遺伝子陽性糞便検体から DPBS で 10% 乳剤を作成し、10,000×g、4 °C、20 分間遠心した上清をウイルス液として用いた。

#### 遠心式フィルターを用いた TCID<sub>50</sub> アッセイ

化合物溶液 (あらかじめ作製した DMSO 溶液を FBS 不含培地で所定濃度に希釈したもの) およびウイルス液 (630-63000 TCID<sub>50</sub>) の混合液を遠心フィルター付きチューブ (Amicon Ultra-0.5 (100 K)、メルクミリポア社製) 内で混合し、室温下静置した。所定の時間反応させた後、FBS 不含培地 450 µL を加えて 20,000 × g、1 分間遠心し、再び FBS 不含培地 450 µL を加え、20,000 × g、1 分間遠心した。ウイルスはチューブのマニュアルに記載の手法に基づいて回収し、FBS 不含培地にて 5 倍段階希釈列を作製した。各希釈液を 96 ウェルプレートに播種した細胞に接種した。3 日後、CPE を観察し、Behrens-Kärber 式によって TCID<sub>50</sub> 値を算出した。試験は 2 回以上繰り返して行った。FBS 添加の実験では、化合物溶液調製時に各濃度の FBS を含む培地を使用した。pH 変化による活性への影響の実験では、10% 塩酸または 4% 水酸化ナトリウム水溶液を添加することで作製した各 pH の培地を使用して、化合物溶液を調製した。

## リアルタイム PCR によるヒトノロウイルス RNA 量の評価

### 化合物感作

ウイルス液 ( $1.2 \times 10^9$  copies/mL) と化合物溶液 (3.6 mg/mL) を 10  $\mu$ L ずつ混和し、室温で 1 時間反応させた後、180  $\mu$ L の DPBS で希釈した。

### RNA 抽出及び DNase 処理

食品衛生検査指針 微生物編 ((公社)日本食品衛生協会)<sup>14)</sup> に準じて、反応液 140  $\mu$ L から QIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン社製) を用い核酸抽出液 60  $\mu$ L を得た。また、同指針に準じ核酸抽出液 12  $\mu$ L を 5  $\times$  First Strand Buffer (インビトロジェン社製) 1.5  $\mu$ L、DNase I 1 U (タカラ社製) を含む DNase 処理液 3  $\mu$ L に加え、37  $^{\circ}$ C、30 分間反応後、75  $^{\circ}$ C、5 分間処理し酵素を失活させた。

### cDNA 合成

逆転写反応は、DNase 処理済 RNA 10  $\mu$ L を PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラ社製) の RT 反応液 10  $\mu$ L に加え 37  $^{\circ}$ C、15 分間反応後、85  $^{\circ}$ C、5 秒間処理し酵素を失活させた。

### リアルタイム PCR による定量

得られた cDNA 5  $\mu$ L を TaKaRa qPCR Norovirus (GI/GII) Typing kit (タカラ社製) の反応液 20  $\mu$ L に加え、95  $^{\circ}$ C、30 秒間処理後、95  $^{\circ}$ C、5 秒間、56  $^{\circ}$ C、34 秒間を 40 サイクル行った。測定機器は、7500 Real-Time PCR system (アプライドバイオシステムズ社製) を使用し、一連の試験を 3 回繰り返して行った。

## リアルタイム PCR による MNV RNA 量の評価

### 化合物感作、RNA 抽出及び DNase 処理、cDNA 合成

リアルタイム PCR によるヒトノロウイルス RNA 量の評価に記載した方法に従った。ウイルス液は、31600 TCID<sub>50</sub>/mL のものを用いた。

### リアルタイム PCR による定量

Premix ExTaq (Perfect Real Time) (タカラ社製) を用い、得られた cDNA 2.5  $\mu$ L を含む全量 25  $\mu$ L の系で実施した。すなわち、Premix ExTaq (2x) 12.5  $\mu$ L、各プライマー (MNV-S および MNV-AS) 200nM、プローブ (MNV-TP) 150 nM、ROX Reference Dye II 0.5  $\mu$ L を含む反応液 22.5  $\mu$ L に cDNA 2.5  $\mu$ L を加えた。プライマーおよびプローブは、北島らの報告<sup>55)</sup> に従った。測定機器は、7500 Real-Time PCR system (アプライドバイオシステムズ社製) を使用し、95  $^{\circ}$ C、30 秒間処理後、95  $^{\circ}$ C、5 秒間、60  $^{\circ}$ C、34 秒間を 40 サイクル実施した。一連の試験は 3 回繰り返して行った。

## アセチル化によるテアフラビンの化学修飾

テアフラビン精製品 (10 mg) を無水酢酸に溶解し、室温にてピリジンを添加した。3 時間後、薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認し、メタノールを加えて過剰の無水酢酸を分解した。減圧下反応液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluent : EtOAc / Hexane = 1 : 1) にて精製し、アセチル化テアフラビン (12 mg) を淡黄色粉末

として得た。得られたアセチル化テアフラビンは複数の生成物の混合物であり、主生成物は、テアフラビンモノガレートの 11 個の水酸基のうち 9 個がアセチル化された化合物であった。ESIMS  $m/z$  1118  $[M+H+Na]^{2+}$

### 細胞増殖阻害試験

第 2 章に関する実験に記載の方法に従って、25  $\mu\text{M}$  または 100  $\mu\text{M}$  に調製した化合物溶液で細胞を 72 時間処理した際の細胞増殖阻害を評価した。試験は 3 回繰り返し行った。

## 引用文献

- 1) 野田衛; 田村務 ノロウイルスの生き残り戦略に関する最新の知見. *Jpn. J. Food Microbiol.* **2014**, *31*, 153–159.
- 2) Robilotti, E.; Deresinski, S.; Pinsky, B. A. Norovirus. *Clin. Microbiol. Reviews* **2015**, *28*, 134–164.
- 3) 厚生労働省 ノロウイルスに関する Q&A. 平成 27 年 6 月 30 日改訂
- 4) 野田衛; 上間匡 ノロウイルスの不活化に関する研究の現状. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.* **2011**, *129*, 37–54.
- 5) Kaufman, S. S.; Green, K. Y.; Korba, B. E. Treatment of norovirus infections: Moving antivirals from the bench to the bedside. *Antiviral Res.* **2014**, *105*, 80–91.
- 6) Rohayem, J.; Bergmann, M.; Gebhardt, J.; Gould, E.; Tucker, P.; Mattevi, A.; Unge, T.; Hilgenfeld, R.; Neyts, J. Antiviral strategies to control calicivirus infections. *Antiviral Res.* **2010**, *87*, 162–178.
- 7) Kim, Y.; Kankanamalage, A. C. G.; Chang, K.-O.; Groutas, W. C. Recent advances in the discovery of norovirus therapeutics. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9438–9450.
- 8) Jones, M. K.; Watanabe, M.; Zhu, S.; Graves, C. L.; Keyes, L. R.; Grau, K. R.; Gonzalez-Hernandez, M. B.; Iovine, N. M.; Wobus, C. E.; Vinjé, J.; Tibbetts, S. A.; Wallet, S. M.; Karst, S. M. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* **2014**, *346*, 755–759.
- 9) Jones, M. K.; Grau, K. R.; Costantini, V.; Kolawole, A. O.; de Graaf, M.; Freiden, P.; Graves, C. L.; Koopmans, M.; Wallet, S. M.; Tibbetts, S. A.; Schultz-Cherry, S.; Wobus, C. E.; Vinjé, J.; Karst, S. M. Human norovirus culture in B cells. *Nature Protocols* **2015**, *10*, 1939–1947.
- 10) 清水優子; 牛島廣治; 北島正章; 片山浩之; 遠矢幸伸 ヒトノロウイルスの代替としてマウスノロウイルスを用いた消毒薬による不活化効果. *環境感染誌* **2009**, *24*, 388–394.
- 11) Hoover, E. A.; Kahn, D. E. Experimentally induced feline calicivirus infection: clinical signs and lesions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1975**, *166*, 463–468.
- 12) Wobus, C. E.; Karst, S. M.; Thackray, L. B.; Chang K.-O.; Sosnovtsev, S.V.; Belliot, G.; Krug, A.; Mackenzie, J. M.; Green, K.Y.; Virgin, H. W.; Replication of norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e432.
- 13) Wobus, C. E.; Thackray, L. B.; Virgin, H. W. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol.* **2006**, *80*, 5104–5112.
- 14) 食品衛生検査指針 微生物編, (公社)日本食品衛生協会, **2015**, 657–772.
- 15) Karst, S. M.; Wobus, C. E.; Lay, M.; Davidson, J.; Virgin IV, H.W. STAT1-dependent innate immunity to a norwalk-like virus. *Science* **2003**, *299*, 1575–1578.
- 16) Saif, L. J.; Bohl, E. H.; Theil, K. W.; Cross, R. F.; House, J. A. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J. Clin. Microbiol.* **1980**, *12*, 105–111.
- 17) Wang, Q.; Zhang, Z.; Saif, L. J. Stability of and attachment to lettuce by a culturable porcine

- sapovirus surrogate for human caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78, 3932–3940.
- 18) Cromeans, T.; Park, G. W.; Constantini, V.; Lee, D.; Wang, Q.; Farkas, T.; Lee, A.; Vinjé, J. Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80, 5743–5751.
  - 19) Ueda, K.; Kawabata, R.; Irie, T.; Nakai, Y.; Tohya, Y.; Sakaguchi, T. Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: Strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a broad range of viruses. *PLoS One* **2013**, 8, e55343.
  - 20) Kamimoto, M.; Nakai, Y.; Tsuji, T.; Shimamoto, T.; Shimamoto, T. Antiviral effects of persimmon extract on human norovirus and its surrogate, bacteriophage MS2. *J. Food Sci.* **2014**, 79, M941–946.
  - 21) Shimamoto, T.; Tsuji, T.; Nakai, Y. Jpn. Tokkyo Koho, **2012**, P5092145.
  - 22) Su, X.; D’Souza, D. H. Grape seed extract for foodborne virus reduction on produce. *Food Microbiol.* **2013**, 34, 1–6.
  - 23) Oh, M.; Lee, J.-H.; Bae, S. Y.; Seok, J. H.; Kin, S.; Chung, Y. B.; Han, K. R.; Kim, K. H.; Chung, M. S. Protective effects of red wine and resveratrol for foodborne virus surrogates. *Food Control* **2015**, 47, 502–509.
  - 24) Wakabayashi, H.; Oda, H.; Yamauchi, K.; Abe, F. Lactoferrin for prevention of common viral infections. *J. Infect. Chemother.* **2014**, 20, 666–671.
  - 25) Hansman, G. S.; Shahzad-ul-Hussan, S.; McLellan, J. S.; Chuang, G.-Y.; Georgiev, I.; Shimoike, T.; Katayama, K.; Bewley, C. A.; Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *J. Virol.* **2012**, 86, 284–292.
  - 26) Arias, A.; Emmott, E.; Vashist, S.; Goodfellow, I. Progress towards the prevention and treatment of norovirus infections. *Future Microbiol.* **2013**, 8, 1475–1487.
  - 27) Takahashi, D.; Kim, Y.; Lovell, S.; Prakash, O.; Groutas, W. C.; Chang, K.-O. Structural and inhibitor studies of norovirus 3C-like proteases. *Virus Res.* **2013**, 178, 437–444.
  - 28) Chang, K.-O.; Takahashi, D.; Prakash, O.; Kim, Y. Characterization and inhibition of norovirus proteases of genogroups I and II using a fluorescence resonance energy transfer assay. *Virology* **2012**, 423, 125–133.
  - 20) Rocha-Pereira, J.; Jochmans, D.; Dallmeier, K.; Leyssen, P.; Cunha, R.; Costa, I.; Nascimento, M. S. J.; Neyts, J. Inhibition of norovirus replication by the nucleoside analogue 2’-C-methylcytidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, 427, 796–800.
  - 30) Rocha-Pereira, J.; Jochmans, D.; Debing, Y.; Verbeken, E.; Nascimento, M. S. J.; Neyts, J. The viral polymerase inhibitor 2’-C-methylcytidine inhibits Norwalk virus replication and protects against norovirus-induced diarrhea and mortality in a mouse model. *J. Virol.* **2013**, 87, 11798–11805.
  - 31) Rocha-Pereira, J.; Jochmans, D.; Dallmeier, K.; Leyssen, P.; Nascimento, M. S. J.; Neyts, J. Favipiravir (T-705) inhibits *in vitro* norovirus replication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, 424, 777–780.

- 32) Rocha-Pereira, J.; Cunha, R.; Pinto, D. C. G.; Silva, A. M. S.; Nascimento, M. S. J. (E)-2-Styrylchromones as potential anti-norovirus agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4195–4201.
- 33) Rossignol, J. F. Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res.* **2014**, *110*, 94–103.
- 34) Matsushima, Y.; Ishikawa, M.; Shimizu, T.; Komane, A.; Kasuo, S.; Shinohara, M.; Nagasawa, K.; Kimura, H.; Ryo, A.; Okabe, N.; Haga, K.; Doan, Y. H.; Katayama, K.; Shimizu, H. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill.* **2015**, *20*, pii=21173.
- 35) Green, K.Y.: *Caliciviridae: The Noroviruses*, In : *Fields Virology*, 6<sup>th</sup> edition (Eds. Knipe, D. M.; Howley, P.M.; Cohen, J. I.; Griffin, D. E.; Lamb, R. A.; Martin, M. A.; Racaniello, V. R.; Roizman, B.), Lippincott Williams and Wilkins, USA, pp 950–979.
- 36) Oka, T.; Ogo, N.; Oba, M.; Ando, T.; Zhu, C.; Asai, A.; Katayama, K.; Wang, Q.; Saif, L. J. Identification of sapovirus infection and growth inhibitory molecules. *American Society for Virology 33rd Annual Meeting*, **2014**.
- 37) 農薬評価書 アバメクチン. 第 31 回中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会参考資料 3, **2012**, 1–72.
- 38) Dionisio, A. C.; Rath, S. Abamectin in soils: Analytical methods, kinetics, sorption and Dissipation. *Chemosphere* **2016**, *151*, 17–29.
- 39) Ikeda, H.; Omura, S. Avermectin biosynthesis. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2591–2609.
- 40) Campbell, W. C. History of avermectin and Ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactones antiparasitic agents. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2012**, *13*, 853–865.
- 41) 石井剛志 茶カテキン類の安定性の向上を目指した凝集・沈殿反応の解析. *東洋食品研究所研究報告書* **2013**, *29*, 183–189.
- 42) Kim, H.-K.; Quion, M. J.; Kim, J.-a New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology* **2014**, *2*, 187–195.
- 43) Dias, T. R.; Tomás, G.; Teixeira, N. F.; Alves, M. G.; Oliveira, P. F.; Silva, B. M. White tea (*camellia sinensis* (L.)): Antioxidant properties and beneficial health effects. *Int. J. Food Sci., Nutr. Diet.* **2013**, *2*, 19–26.
- 44) Ali, N.; Roshdy, E.; Sabry, M.; Al-Hendy, A. Green tea: varieties, production and health benefits, In: *Food and beverage consumption and health* (Eds. Wu, W.), Nova Biochemical, USA, **2013**, pp 33–74.
- 45) Oka, T.; Yokoyama, M.; Katayama, K.; Tsunemitsu, H.; Yamamoto, M.; Miyashita, K.; Ogawa, S.; Motomura, K.; Mori, H.; Nakamura, H.; Wakita, T.; Takeda, N.; Sato, H. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. *Virology* **2009**, *394*, 119–129.

- 46) Jhoo, J-W.; Lo, C.-Y.; Li, S.; Sang, S.; Ang, C. Y. W.; Heinze, T. M.; Ho, C.-T. Stability of black tea polyphenol, theaflavin, and identification of theanaphthoquinone as its major radical reaction product. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6146–6150.
- 47) Shimamura, T.; Hara, M. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, **1991**, 平 3-101623.
- 48) Yang, Z. F.; Bai, L.-P.; Huang, W.-B.; Li, X.-Z.; Zhao, S.-S.; Zhong, N.-S.; Jiang, Z.-H. Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure-activity relationship analysis. *Fitoterapia* **2014**, *93*, 47–53.
- 49) Li, S.; Lo, C.-Y.; Pan, M.-H.; Lai, C.-S.; Ho, C.-T. Black tea: chemical analysis and stability. *Food Funct.* **2013**, *4*, 10–18.
- 50) Su, X.; D'Souza, D. H. Inactivation of human norovirus surrogates by benzalkonium chloride, potassium peroxymonosulfate, tannic acid, and gallic acid. *Foodborne Pathog. Dis.* **2012**, *9*, 829–834.
- 51) 中村優子; 高橋祐介; 景山誠二 高機能紅茶飲料の開発. 鳥取県産業技術センター研究報告 **2012**, *15*, 62–65.
- 52) Kim, Y.; Lovell, S.; Tiew, K.-C.; Mandadapu, S. R.; Alliston, K. R.; Battaile, K.; Groutas, W. C.; Chang, K.-O. Broad-spectrum antivirals against 3C or 3C-like protease of picornaviruses, noroviruses, and coronaviruses. *J. Virol.* **2012**, *86*, 11754–11762.
- 53) Behrens, B.; Kärber, G. Wie sind Reihenversuche für biologische Auswertungen am zweckmäßigsten anzuordnen? *Arch. exptl. Path. Pharmacol.* **1934**, *177*, 379-388.
- 54) Chang, K.-O.; Sosnovtsev, S. V.; Belliot, G.; Kim, Y.; Saif, L. J.; Green, K. Y. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 8733–8738.
- 55) Kitajima, M.; Oka, T.; Takagi, H.; Tohya, Y.; Katayama, H.; Takeda, N.; Katayama, K. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *J. Virol. Methods* **2010**, *169*, 269–273.