

研究報告書

「細孔性結晶を用いた微量薬物の分解・代謝過程の可視化」

研究タイプ: 通常(3年)型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 猪熊 泰英

1. 研究のねらい

本研究では、細孔性結晶ホストに微量の化合物を包接させ単結晶X線構造解析を行う手法を駆使し、代謝物や薬品の分解物、反応副生物などの構造を網羅的に解析する手段を構築する。そして、代謝過程や未知の反応の素過程を出発物質の構造変化によって可視化することで、複雑な反応系の理解や新規反応の開拓へと繋げる。本研究の基盤となる技術は、「結晶スポンジ法」と呼ばれる細孔性錯体結晶にサンプルを浸み込ませて結晶構造解析する新手法であるが、この手法では水溶性化合物や分子サイズの大きな化合物等を解析するためのホストが未開拓であり、夾雑物が含まれるサンプルからの解析が困難であるなど技術的な課題も多くある。このような課題を克服し、より実用的で一般性のある解析を確立するために、結晶構造ライブラリからの候補化合物の探索や有機合成によるテーラーメイド型細孔性ホストの創出を鍵として細孔性結晶ホストの多様化を図る。また、微生物などから抽出される実際の代謝物を構造解析することで、proof-of-concept から一步踏み出した応用を実現する。代謝解析の具体的な対象としては、薬理活性が高く立体化学の決定が重要となるステロイド化合物を中心に、抽出、液体クロマトグラフィーによる分離・精製を経て、キラルな代謝物であってもその絶対構造解析までを可能にする代謝解析方法を目指す。また、分子量が 500 を越える巨大な化合物の解析に向けては、巨大な細孔を持つホストの創出や細孔空間の構築と同時に包接を行うなどの新たな手法に挑戦することで、現状では不可能と思われる高分子化合物やタンパク質の構造解析にも繋がり得る構造解析手法へと進化させる。

この研究で開発する技術をもって微量の代謝物や分解物を構造解析し、その生成メカニズムを明らかにすることで、未知の反応や新奇構造体の発見にも繋がるのが期待される。分子構造を扱う分野への技術提供にとどまることなく、微量化合物の構造解析が切り拓く新たな有機化学を学術的にも確立させることも重視する。

2. 研究成果

(1) 概要

水溶性化合物や巨大化合物の構造解析に適した新規細孔性結晶ホストを創出し、パン酵母を用いた実践的な代謝物における絶対構造の解析に成功した。水溶性ゲストを細孔に包接し構造解析するための戦略として、糖を部分構造に組み込んだ新規有機配位子を設計し、アルカリ金属イオンとの錯形成により新たな1次元細孔を持つ細孔性結晶を合成した。(論文2)これにより、親水性の化合物を多点水素結合により分子認識し、強く取り込むことができるようになった。また、細孔性結晶を用いた結晶構造解析の適用範囲を大きく広げるべく、Cambridge Structural Database (CSD)を用いた半経験的な検索方法を確立し、数万個もの細

孔性結晶のライブラリから目的の大きさ、化学的環境をもったホスト化合物を選定することができるようになった。(論文4)その中で、これまでの結晶スポンジの限界を突破する直径 1 nm 以上の大きな細孔をもったホストを見つけ出し、実際に結晶スポンジ解析を行うことができた。

代謝・分解物の実用的な解析として、既存の結晶ホストを用いた爆発性オゾニドの構造解析(論文3)やパン酵母によるカルボニル基を含むステロイド化合物や芳香族化合物の立体選択的還元反応を構造解析により追跡することを行った。(論文2) 特に、代謝物の解析では、結晶構造解析に適した数マイクログラム量の代謝物を調製するために高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と結晶スポンジ解析用バイアルへの自動分取システムを組み合わせた装置構成を行った。そして、種々の条件検討を経て、夾雑物の多い代謝系から導入した親化合物に由来する代謝物を選択的に分離・精製し、構造解析することに成功した。また、単結晶構造から代謝物の絶対立体配置まで明らかにすることができた。このカルボニル基に関連した代謝物の解析に成功したことで、高度にカルボニル化された有機化合物の反応性やその反応が生み出す新規化合物に新たな学問の可能性を見出し、脂肪族ポリカルボニル化合物の構造有機化学という新展開に繋がっている。

(2) 詳細

研究テーマ A 「水溶性ゲスト包接のための新規結晶ホスト”シュガースポンジ”の開発」

2つの D-マンノースをフェニレン架橋したキラル糖配位子(1)を合成し、アルカリ金属との錯形成を行うことで、糖由来の水酸基が多数張り出した親水性1次元チャンネル型細孔(シュガースポンジ)2を持つ新規細孔性結晶の合成に成功した。

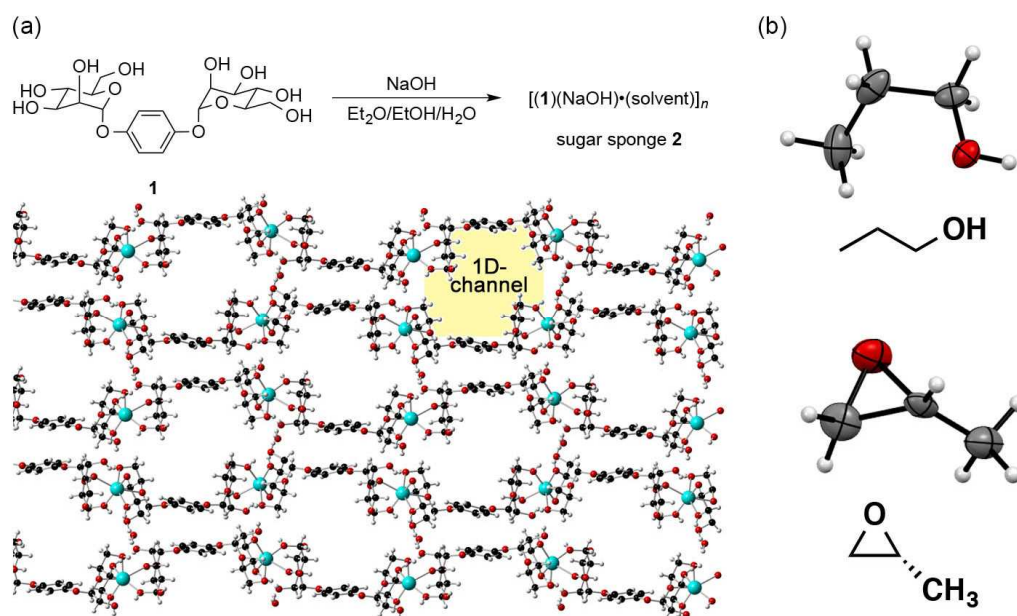


図 1. (a) シュガースポンジの合成と(b)結晶構造解析に成功した親水性ゲスト化合物

この錯体結晶を親水性である 1-プロパノールのジイソプロピルエーテル溶液に浸漬させたところ、1-プロパノールのみが選択的に細孔内に取り込まれ、水素結合によりその立体配座

までが完全に固定化された状態で単結晶X線構造解析できた(図1)。多点水素結合によるゲスト化合物の固定化はX線回折データの向上をもたらし、これまでの結晶スポンジ法を越える精度での構造解析に繋がった。さらに、この性質を利用して、水溶性キラル化合物であるプロピレンオキシドの絶対立体配置の決定を行った。シュガースポンジには、絶対立体配置が既知の D-マンノースが組み込まれているため、キラルなゲスト化合物が持つ不斉要素の絶対立体配置を相対的に決定することができる。R および S 体のプロピレンオキシドをそれぞれシュガースポンジに包接し単結晶X線解析を行ったところ、炭素原子と酸素原子が識別可能な精度で良好なX線データが得られ、それぞれの絶対立体配置をX線データから完全に見分けることができた。(論文2)

研究テーマ B 「結晶学ライブラリを用いた新規結晶ホストの選定法」

結晶構造ライブラリCSDに登録されている5万を越える MOF の構造に比べると、結晶外部から導入したゲスト化合物の結晶構造解析に用いることができると報告されている結晶スポンジの数は非常に少なく、10 にも満たない。これは、新たな細孔性結晶ホストの設計指針や最適条件の検討方法が十分に確立されていないという要因が大きい。そこで、これまでの結晶スポンジ法解析により分かってきた結晶スポンジが持つべき半経験的な条件をライブラリ検索に適用することで、結晶スポンジの有力な候補化合物を効率的に見出し、溶媒やゲスト包接の条件を実験的に整えることで、迅速かつ目的志向型の新規結晶スポンジ創出を行った。

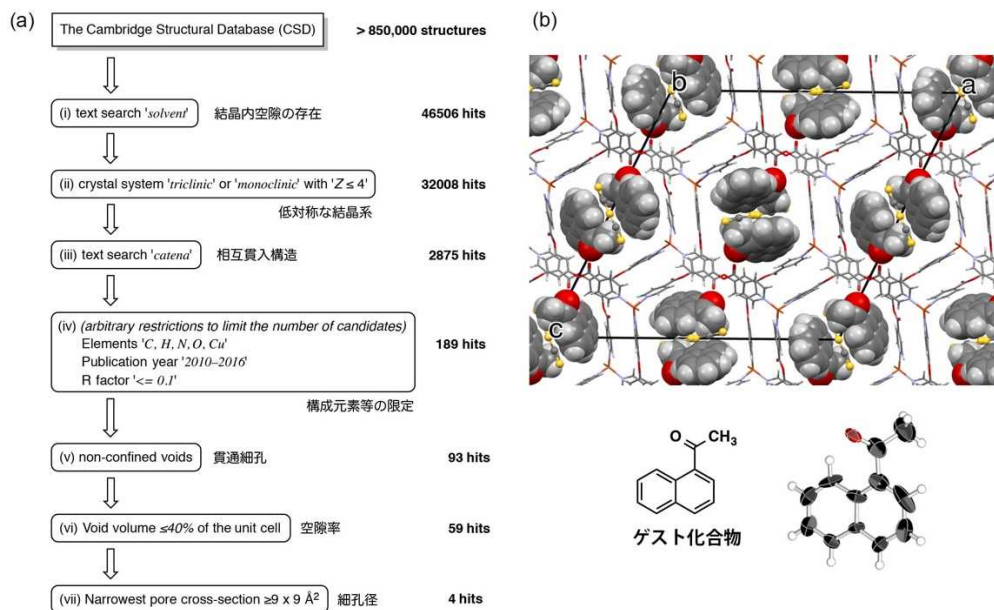


図2. (a) CSD を用いた結晶スポンジ候補化合物の検索手順と(b)最有力候補化合物を用いた1-アセトナフテンの構造解析

このアイデアの実証にあたっては、ライブラリ検索の目標を、これまでの結晶スポンジ(8 × 5 Å²)よりも大きな細孔断面積を持った結晶スポンジに設定した。CSD のライブラリに対し、①貫通形空隙の存在、②低対称性の構造、③相互貫入型ネットワーク構造、④細孔体積率4

0%以下等の半経験的条件を適用したところ、2800以上の構造が候補として挙がることが分かった。さらに、目的とする細孔径やデータの信頼度を厳しく設定することで、最終的な候補を4つに絞り込んだ(図2(a))。実際にそのうちの1つを報告に従って合成し、溶媒条件を検討したところ、トルエン、二硫化炭素、クロロホルム、シクロヘキサン等がこの新規ホストの結晶性を劣化させることなく共存できることが分かった。さらにゲスト分子をこれまでに結晶構造の報告がなかった室温で液体の1-アセトナフテンに設定し、直接接触実験、溶液への浸漬実験から結晶スポンジ法を行う上での適切な条件を割り出した。(論文4)最終的に、二硫化炭素のゲスト溶液に3日間浸漬させることで、1-アセトナフテンが1次元細孔に2列に並んだ包接結晶の構造を決定することに成功した(図2(b))。

研究テーマC「パン酵母由来代謝物の結晶構造解析」

パン酵母が有機化合物を代謝することで生じる代謝物の構造を、細孔性結晶ホストを用いて決定することに成功した。この代謝物の構造解析では、夾雑物の多い代謝混合物の中からいかに目的とする代謝物を抽出・単離するかが重要となる。そこで、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)による分取システムを最適化し、夾雑物の少ないフラクションのみを少量ずつ連続的に分取できるように改良した(図3)。すると、夾雑物の多い分取サンプルからでは十分な結晶学データが得られなかった1,1-ビス(4-クロロフェニル)-2,2,2-トリクロロエタン(DDT)の脱塩素化代謝物の構造を明瞭に観測することができた。

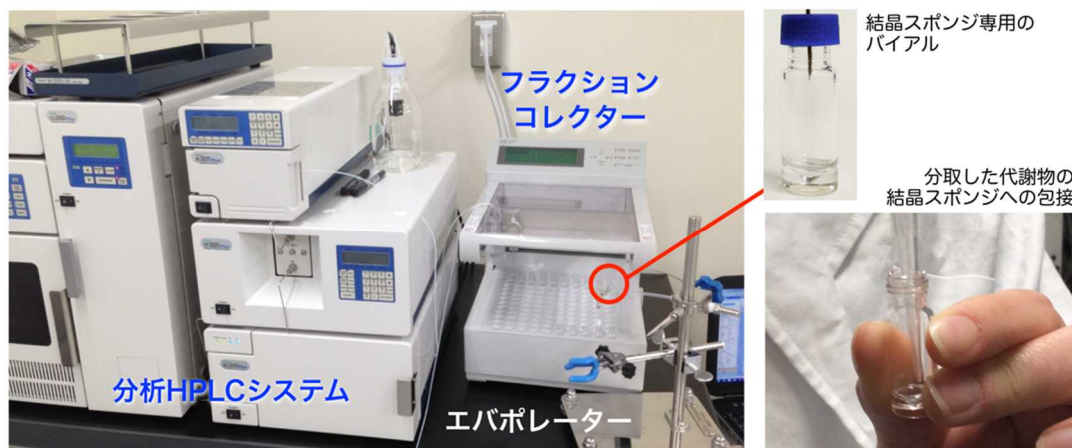


図3. 代謝物を分析・単離し、結晶スポンジ法に繋げるための HPLC セッティング

次に、最適化された HPLC システムによるサンプル分取を用いてテトラロン誘導体の不斉還元代謝物を行った。この代謝物の絶対立体配置は、過去に類縁体化合物の還元代謝物を基に推定されるのみに留まっていたが、結晶スポンジ法による単結晶X線構造解析で初めて1*R*2*S*体であることが確認された(図4(a))。これにより、1,3-ジカルボニル基のケト-エノール互変異性を經由して溶液中で速い平衡にある1*R*および1*S*体のうち1*R*体のみがパン酵母によって選択的に還元され、かつ、2位のプロキラルな炭素の*Re*面からヒドリド還元が起こっている

という還元機構の推定にまで至ることができた。(論文1)

さらに、パン酵母により還元代謝を受けうるカルボニル基を分子内に3つ持つアドレノステロンというステロイド化合物の代謝解析に挑戦した。HPLC による分析では、パン酵母は1つの代謝物をほぼ排他的に生成していることが分かったが、アドレノステロンの化学的な還元では、少なくとも26種類の代謝物が想定される上、NMRや質量分析からは、その還元箇所を特定することが困難であった。そこで、この代謝物を結晶スポンジ法で解析したところ、ステロイドの17位のカルボニル基がS体のアルコールへと選択的に還元されていることが分かった(図4(b))。この結果から、本研究で開発した代謝物の解析法が、これまでの手法では構造決定が困難な化合物にも効果を発揮できることが示された。

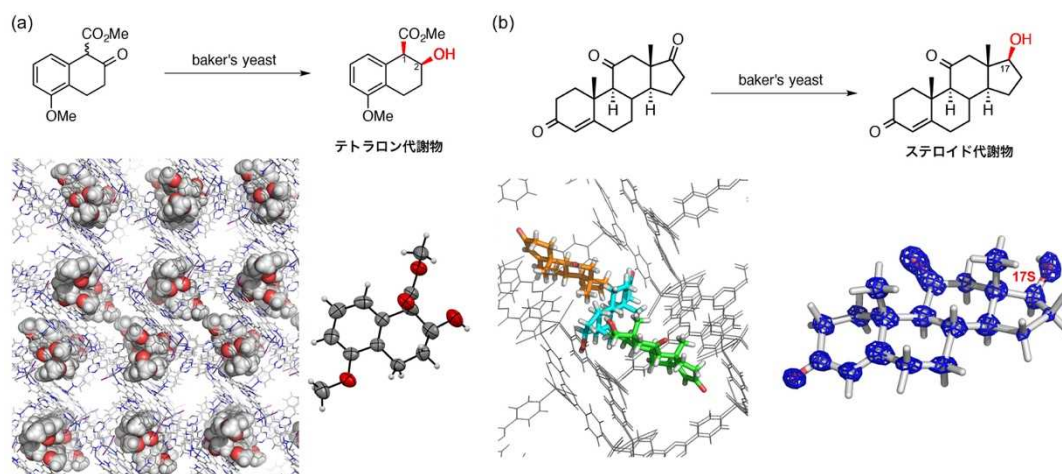


図4. (a)テトラロンおよび(b)ステロイド誘導体(アドレノステロン)のパン酵母代謝物の結晶構造解析

3. 今後の展開

微量の代謝物や分解物を標的とした構造解析の手法を開発、発表できたことで、普段はX線結晶構造解析をあまり用いていないような生化学、農学の分野にまで結晶スポンジ法ならびに単結晶X線構造解析が浸透してゆくことが期待される。本研究では、実用に近い条件下で構造解析を行い様々な改良をもたらすことができたが、それでもまだ技術的・解析的に改善を要する点は多くある。その中でも特に、解析する化合物に応じた新規結晶ホストの開発は必須であると言える。この新規ホストの創出には、本研究の成果が大いに役立つと考えている。Metal-organic framework (MOF)や porous coordination polymer (PCP)と呼ばれる細孔性錯体の結晶は合成が簡便で報告も多いため、本研究で確立されたライブラリ検索を使った迅速な候補化合物検索は、合理的に新規結晶ホストの幅を広げていくと考えている。さらに、疎水性の環境を持った細孔性結晶が多い中で、水溶性化合物の解析のための細孔設計指針を提唱できたことはタンパク質などの生体分子の構造解析にも繋がる結果である。より実用的には、夾雑物の影響評価など明らかにしたことで、さらなる応用利用が異分野にも広がってゆくと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究におけるメインテーマである新規結晶ホストの開発、代謝物の解析に関しては、当初の計画通りあるいはそれ以上の成果が得られたと考えている。水溶性化合物の結晶スポンジ解析を可能にしたシュガースポンジの開発においては、有機合成や超分子化学を駆使したデザインをホストの構造に組み込むことで、通常の細孔性錯体では達成できない高度な分子認識や絶対立体配置の解析を可能にした。結晶スポンジ法を世界的に広める上では、ライブラリ検索のアイデアが非常に重要な成果となったと考えている。代謝物の解析においても、1つのホストがあらゆる代謝物の構造解析に使えるということではなく、分子サイズや化学的性質に応じてホストを使い分けることが必要となってくる。その上では、結晶学ライブラリではなく、結晶スポンジライブラリの存在が不可欠である。現在そのライブラリには10種類程度しか結晶スポンジがないが、CSDを用いた結晶構造検索では、数千を超える候補化合物が見つまっている。世界中の研究者達がこの手法をもとに結晶スポンジ開発を行う事で、ホストの種類は桁違いに増加すると期待される。このアイデアを実証し、発表できたことは非常に大きいと考えている。

パン酵母を用いた代謝物解析では、結晶スポンジ法を実用の現場で用いる際の課題が明確に認識でき、それを装置開発も伴いながら克服することができた。特に、解析対象物の化学的な純度が構造解析の成功において鍵となることを化学の一流誌で発表できたことは、手法の正しい理解に繋がると考えている。目標に掲げていたステロイドなどキラルな化合物の構造解析においても、結晶学的に十分なデータ精度で解析に成功するとともに、その構造から反応機構の詳細な解析を行うこともできた。

本研究を通して、構造と反応の相関をより深化させたことで、学術研究における新たな分野の可能性も拓けてきた。一連の研究において、パン酵母の代謝物にみられたようなカルボニル化合物を複数配置した巨大化合物の結晶構造解析の可能性も見出したことは、今後、研究者としてさらに大きな化学を展開する上で価値が高いと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

(研究総括)

新規結晶ホスト材料(シュガースポンジ)の創製、パン酵母代謝物の構造決定、さらにライブラリーを用いたホスト候補探索法の開発など、水溶性化合物の結晶構造解析を目指す当初の目標を充分達成しています。

さきがけ研究期間内に方針の変更がありましたが、領域アドバイザー等との議論を通して、しっかりとした研究戦略を立て研究が展開できたと思います。さらに、領域内を問わず国内外の研究者との議論を積極的に行い、研究の幅、研究者ネットワークの拡大に繋がりました。

従来の結晶スポンジ法には様々な制約がありましたが、今回の研究によって、対象となる物質が大きく拡張されました。結晶化が困難で、構造を決定しきれない有用な生体分子等の構造を決定し得る技術は産業界に大きな恩恵をもたらすと思われます。今後、良い共同研究先の選択により、さらに質の高い研究に展開できることが期待されます。

最後に、論文についても質は高く、さらに多くの表彰・受賞があり、大きな飛躍に繋がりました。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Yasuhide Inokuma, Tomoya Ukegawa, Manabu Hoshino, Makoto Fujita. “Structure determination of microbial metabolites by the crystalline sponge method”. <i>Chemical Science</i> . 2016 , 7, 3910–3913.
2. Guo-Hong. Ning, Kazuki Matsumura, Yasuhide Inokuma, Makoto Fujita. “A saccharide-based crystalline sponge for hydrophilic guests”. <i>Chemical Communications</i> . 2016 , 52, 7013–7015.
3. Shota Yoshioka, Yasuhide Inokuma, Vincent Duplan, Ritesh Dubey, Makoto Fujita. “X-ray Structure Analysis of Ozonides by the Crystalline Sponge Method”. <i>Journal of the American Chemical Society</i> . 2016 , 138, 10140–10142.
4. Yasuhide Inokuma, Kazuki Matsumura, Shota Yoshioka, Makoto Fujita. “Finding a New Member of Crystalline Sponge from a Crystallographic Database”. <i>Chemistry Asian Journal</i> 2017 , 12, 208–211.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発 明 者: 藤田 誠、猪熊 泰英

発明の名称: 細孔性高分子化合物、分離対象化合物の分離方法、単結晶、結晶構造解析用試料の作製方法、解析対象化合物の分子構造決定方法、及びキラル化合物の絶対配置の決定方法

出 願 人: 国立大学法人 東京大学

出 願 日: 2015/3/4

出 願 番 号: 特願 2015-42308

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表(招待講演)

1.

学会名: RSC Tokyo International Conference 2016

演題: “Crystalline sponge method for single crystal X-ray analysis of trace compounds”

開催地: Makuhari International Conference Hall, Chiba, Japan



発表日: 2016 年 9 月 9 日

2.

学会名: The 70th Fujihara Seminar

演題: “The Crystalline Sponge Method for Structure Determination”

開催地: The Luigans Spa & Resort, Fukuoka, Japan

発表日: 2016 年 4 月 18 日

受賞

2016 年 4 月 東京大学工学系研究科長表彰

2015 年 9 月 永瀬賞 特別賞

2015 年 4 月 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

2014 年 12 月 ナイスステップな研究者 2014

2014 年 4 月 丸山記念研究奨励賞

2014 年 3 月 日本化学会 進歩賞