東京大学
THE UNIVERSITY OF TOKYO

「結晶スポンジ法による極小量化合物のＸ線結晶構造解析」

１．発表者：　藤田　誠（東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻　教授）
猪熊泰英（東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻　助教）

２．発表のポイント

◆どのような成果を出したのか

結晶スポンジと呼ばれる材料にわずか数マイクログラムの試料を吸収させるだけで、Ｘ線結晶構造解析により試料の分子構造を正確に決定できる手法を開発しました。

◆　新規性（何が新しいのか）

従来の単結晶Ｘ線構造解析では試料の結晶化という過程は避けられず、油状あるいは量の少ないサンプルは測定することができませんでした。この手法を用いると、ナノからマイクログラム量（1ｇの 1/1000000 以下）の試料を結晶化させることなくＸ線構造解析ができるようになります。論文審査員から、「結晶構造解析の大躍進」という絶賛をいただきました。

◆社会的意義／将来の展望

医薬品の開発、食品や香料に含まれる微量成分の分析、大学や企業における有機合成研究など、分子の構造決定を必要とするあらゆる分野で大活躍する技術になると期待されています。

３．発表概要：

単結晶Ｘ線構造解析は、分子の構造を正確に決定できる強力な手段として基礎研究から産業界まで多くの分野で利用されています。しかし、この測定手法はサンプルが単結晶でなければ利用できないという大きな弱点がありました。通常、有機化合物の単結晶は再結晶法などにより作製されますが、従来の手法はあらゆる化合物に対し必ず単結晶が得られるわけではなく、油状の化合物や非常に微量のサンプルは、実質的には単結晶を得る手段がありませんでした。

東京大学大学院工学系研究科の藤田誠教授らは、結晶スポンジと呼ばれる直径約 0.5～1 ナノメートル[注1)] 程の穴が無数に空いた結晶材料を使って、その穴の中にわずか数十～数百ナノグラム[注2)] の有機化合物を取り込むことで単結晶Ｘ線構造解析を行い、サンプルを結晶化することなく分子の結晶構造を得ることに成功しました。(添付資料)　この手法を用いれば、従来の方法では結晶化しない化合物でさえも、多くとも５マイクログラム[注3)]、最も少ない場合では、なんと８０ナノグラムというサンプル量で結晶構造解析を行うことができます。

藤田教授らは、この”結晶スポンジ法”を用いて、医薬品成分、ミカンの皮からごく僅かに得られるフラボノイドと呼ばれる一連の化合物、深海４００メートルで採取される海綿から抽出したミヤコシンＡという希少な化合物の結晶構造決定に次々と成功しました。

この研究成果は、医薬、食品、農薬、香料など有機化合物を扱う多くの分野に革新的な分析手法をもたらすことが期待されます。

４．発表内容：

分子構造を決定する上で最も強力な手段とされる単結晶Ｘ線構造解析には、測定サンプルを単結晶で用意しなければならないという大きな制約がありました。そのため、油状の化合物や再結晶を行うに足る量が確保できないサンプルに関しては、”単結晶が得られない”という理由だけで測定を諦めざるを得ない状況にありました。

東京大学大学院工学系研究科の藤田誠教授ら研究グループは、結晶スポンジと呼ばれる細孔性錯体結晶[注4)]を用い、測定したい有機分子を溶液中から選択的に吸蔵し細孔内に配列させることで、わずか数マイクログラムのサンプルから結晶化の過程を経ずに単結晶Ｘ線構造解析することに成功しました。（添付資料）

細孔性錯体が細孔と呼ばれる穴の中に分子を吸蔵することは以前から知られていました。しかし、一般的な細孔性錯体では吸蔵された分子がランダムな方向を向いてしまうため、単結晶の周期性を利用して測定を行うＸ線回折では取り込まれた分子の構造を決定することが非常に困難でした。同グループは、細孔性錯体に分子認識能[注5)]を持たせることで周期性を持った細孔性錯体の骨格に沿って取り込まれた分子を周期配列させることに成功し、常温で液体の化合物であっても結晶化をせずに単結晶Ｘ線構造解析することができるようになりました。

さらに、この手法は１種類の測定サンプルに対し 100 マイクロメートル角の細孔性錯体結晶をたった１粒しか必要としないという特徴があります。このサイズの細孔性錯体が吸蔵する分子の量は、多くとも 0.5 マイクログラムです。つまり、数マイクログラムという目に見えないほど少量のサンプルであっても、この手法を用いれば単結晶Ｘ線構造解析により分子構造を解明することができるようになったのです。

同グループは、この新手法を使ってさらに微量の化合物を分析する実験を行いました。すると、グアイアズレンと呼ばれる炭化水素化合物の構造をたった８０ナノグラムのサンプル量から決定することに成功しました。

この分析手法が未知の化合物を構造決定する際にどれほど有効なのか？この疑問に答えるべく、ブラインド試験が行われました。被験者に５マイクログラムのサンプルが溶解した溶液と結晶スポンジ１粒を渡し、本手法に従って単結晶Ｘ線構造解析を行ってもらいました。６種類の化合物に関してブラインド試験を実施したところ、なんとＸ線回折のデータのみで３種類の化合物が完全に構造決定されました。残りの３つに関しては質量分析のデータと組み合わせることで全て正しい分子構造を導き出すことができました。この結果は、同グループの手法が未知の微量化合物に対しても絶大な効果を発揮できることを示しています。

通常、動植物から抽出される微量成分の多くは液体クロマトグラフィーを用いて分離・分析されます。その際に単離されるサンプルは、僅か数マイクログラム以下でしかありません。これまでの手法は、このように微量のサンプルから複雑な分子構造を決定することは至難の業でした。同グループは、”結晶スポンジ法”を液体クロマトグラフィーと組み合わせることで、LC-SCD(Liquid Chromatography–Single Crystal Diffraction)という新しい分析手法を確立し、液体クロマトグラフィーによって分離された複数の微量成分を一気に単結晶Ｘ線構造解析することにも成功しました。論文中の実例においては、ミカンの果皮から抽出されるフラボノイドと呼ばれる成分の LC-SCD 分析を行い、３種類のフラボノイドの構造決定を報告しています。

今回の研究において”結晶スポンジ法”が最も効果を発揮したのは、海洋天然物の構造決定でした。ミヤコシンＡは、深海４００ｍ付近に生息する海綿から抽出される微量成分の１つです。この化合物の絶対構造は、これまでいかなる方法を用いても決定することができていませんでした。この絶対構造を決定できるのは、Ｘ線結晶構造解析しかないという予測はありましたが、希少なサンプルから単結晶を得ることはほぼ不可能とも言える事でした。しかし、”結

晶スポンジ法”を使うことで、たった５マイクログラムのサンプルからミヤコシン A の完全な絶対構造が決定できてしまったのです。

今回の発表において同グループは、１０種類以上の微量化合物の構造決定を報告していますが、これは未だほんの一部に過ぎません。微量成分の構造決定を必要としている分野は、基礎研究にとどまらず、医薬品の開発、食品の安全検査、科学捜査、香料の研究など私たちにとって身近な所に多数あります。この”結晶スポンジ法”は、そういった多くの分野に多大な貢献をすることが期待されています。

本研究は、以下に示す研究グループとの共同研究で行われました。

東京大学大学院農学生命科学研究科　松永研究室（教授 松永茂樹）：希少海洋天然物試料および構造情報の提供）

ユバスキュラ大学（フィンランド）　カリ・リサネン教授：X線データの正当性の検証

本研究は、科研費特別推進研究の支援により行われました。一部の成果は JST CREST の支援を受けています。

５．発表雑誌：

雑誌名：「Nature」

論文タイトル： X-ray analysis on the nanogram to microgram scale using porous complexes

著者： Yasuhide Inokuma, Shota Yoshioka, Junko Ariyoshi, Tatsuhiko Arai, Yuki Hitora, Kentaro Takada, Shigeki Matsunaga, Kari Rissanen & Makoto Fujita*

DOI 番号：10.1038/nature11990

６．問い合わせ先：　東京大学大学院工学系研究科 応用化学専攻 教授　藤田 誠

７．用語解説：

注１）**ナノメートル（nm）**

１ナノメートルは、１０億分の１メートル。

注２）**ナノグラム（ng）**

重さの単位。１ナノグラムは、１０億分の１グラム。

注３）**マイクログラム（μg）**

１マイクログラムは、１００万分の１グラム。

注４）**細孔性錯体**

細孔と呼ばれる穴が無数に空いた錯体。細孔のサイズや用いられる配位子により、ガスの吸蔵など様々な性質を示すことが知られている。

注５）**分子認識能**

特定の分子と選択的に近づいたり、穴に取り込んだりする能力。人工の分子からタンパク質まで、様々な分子が分子認識を用いて特定の化合物と選択的に相互作用することが知られている。

８．添付資料：

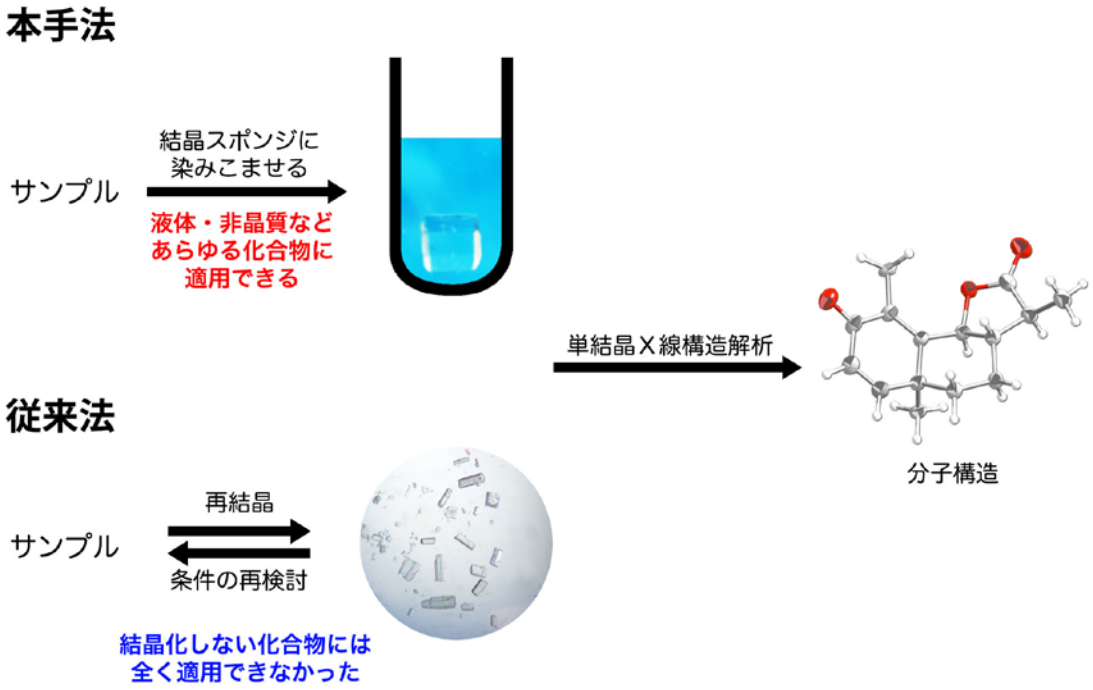

図1. 本手法と従来法の比較:従来法では、結晶化しない化合物に単結晶Ｘ線構造解析を用いることは不可能であったが、結晶スポンジ法を使うことで液体や微量の化合物に関しても結晶化の過程を経ずに結晶構造解析できるようになった。

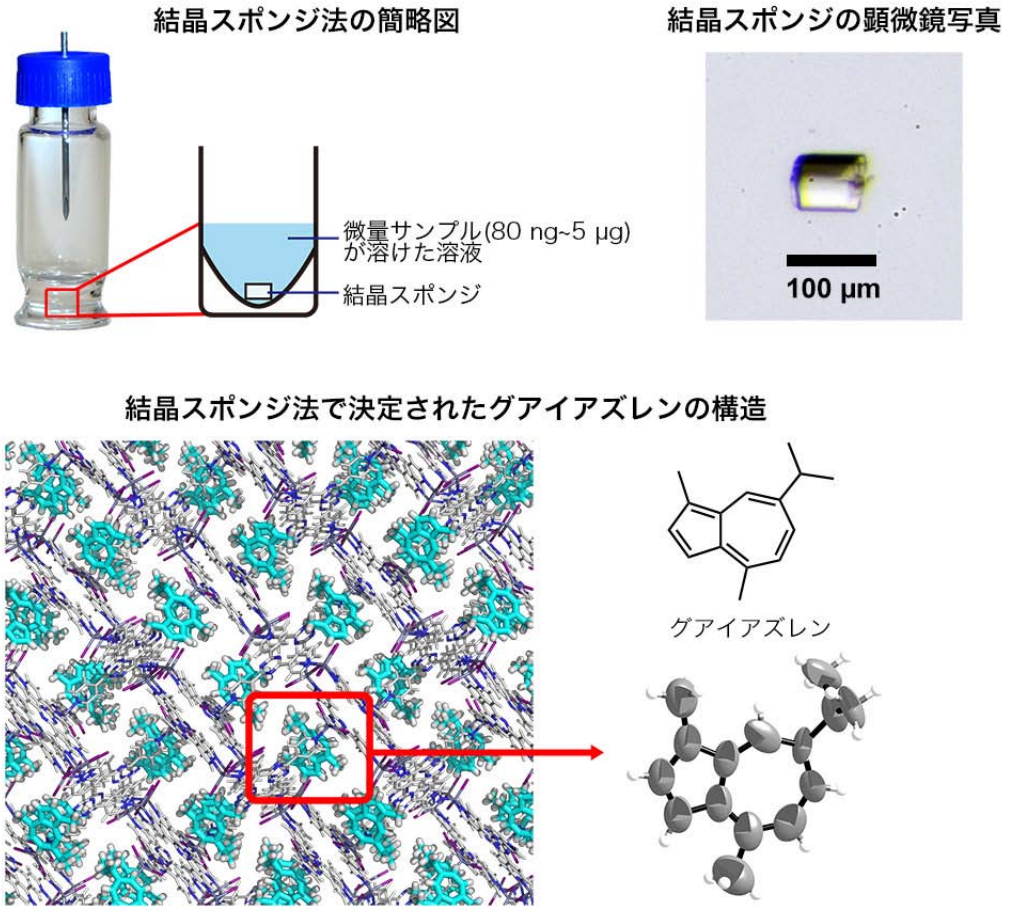

図2. 実際の実験操作:微量測定試料(80 ng ～5 μg)を適当な溶媒に溶かし、結晶スポンジ（0.1 mm 角の小さな細孔性結晶）をいれた試料ビンに注ぐ。溶媒はゆっくり蒸発させると、結晶スポンジの中に試料が濃縮される。この結晶を取り出し、通常の X 線結晶構造解析を行うと、スポンジの骨格だけでなく、スポンジの穴にしみ込んだ試料化合物の構造が観測できる。

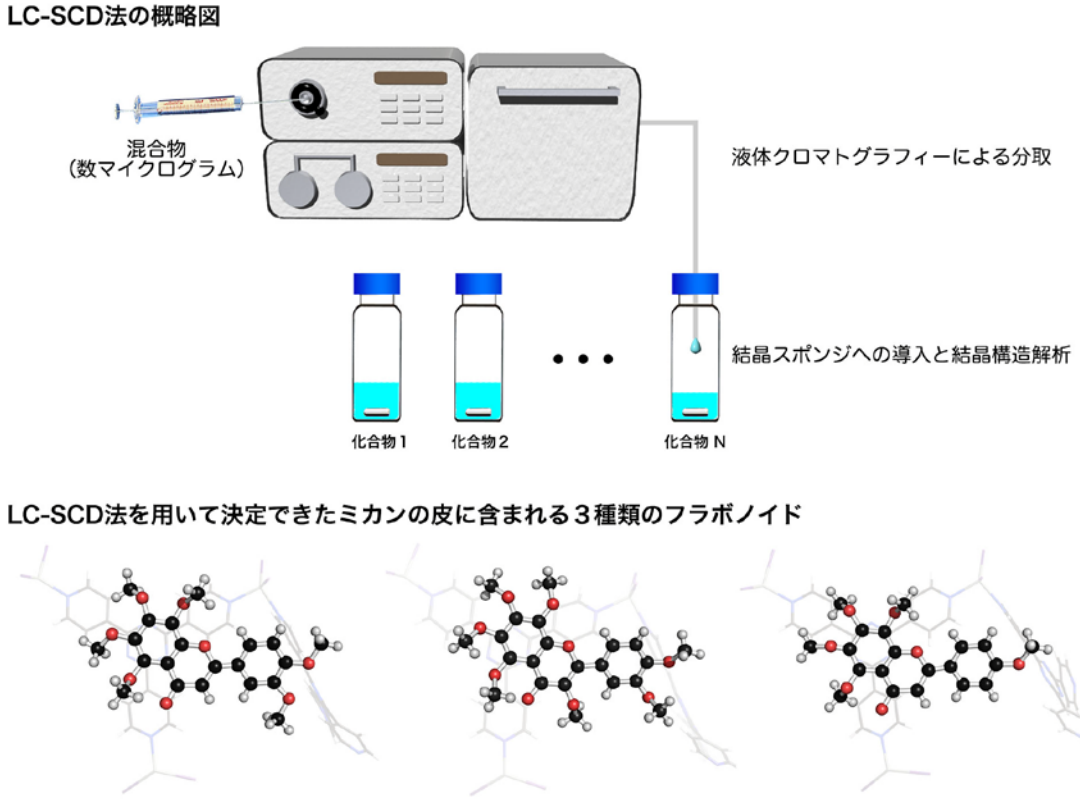

図3. LC–SCD分析:混合物から液体クロマトグラフィーで分離した微量試料を結晶スポンジに吸収させ、それぞれの構造を結晶構造解析することができる。液体クロマトグラフィーとＸ線結晶構造解析を直結させた画期的な分析手法が誕生した。

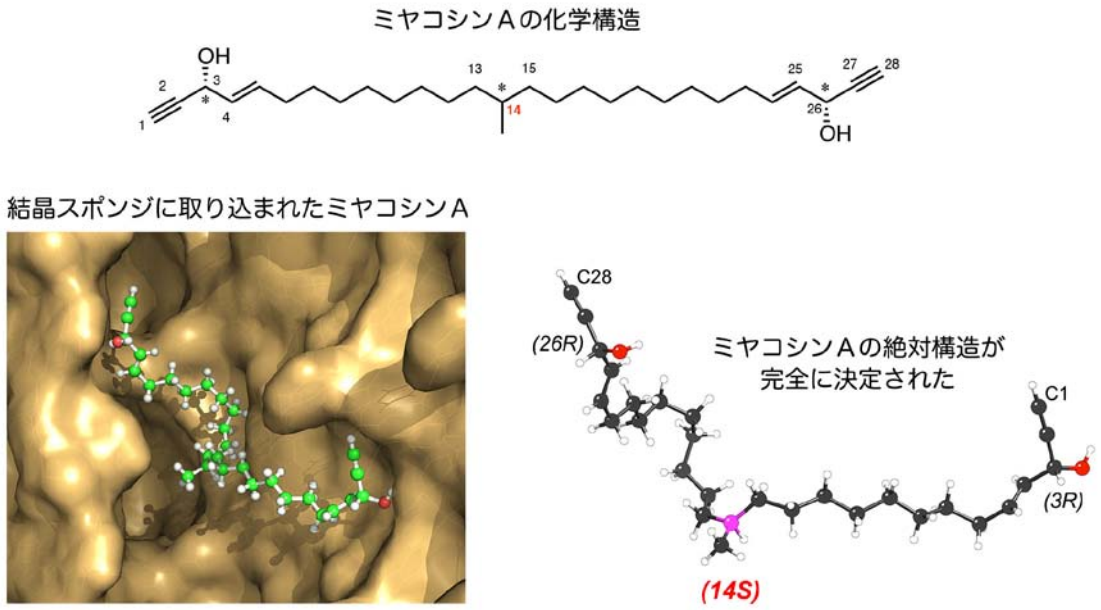

図4. 天然物構造決定への応用:結晶スポンジ法によりミヤコシンＡ（希少海洋天然物）の構造をわずか５μｇの試料で正確に決定できた。