

博士論文（要約）

**Workflow Innovations in Natural Product Chemistry
with the Crystalline Sponge Method**

（結晶スポンジ法による天然物化学研究のワークフロー刷新）

和田 直樹

生体試料から天然物を単離抽出し構造決定することは、化合物を評価する化学的な面からだけではなく、その薬理活性を探索し医薬品候補化合物を発見する創薬の面からも意義深い。一般に、確度の高い天然物の構造解析を行うためには最低でも数十mgスケールのサンプルを要する。天然物の単離抽出においては多量（kgスケール）の生体試料から目的天然物が微量（mgスケール）でしか得られないことは多く、スケールアップ実験はしばしば必要となる。しかし、生体試料の採取量が限られている、菌体培養における天然物の産生効率がもともと低いなどの理由で、実験系のスケールアップ検討を行えない場合もある。その結果、天然物の単離構造決定では、単離抽出工程の最適化にかかる時間・コストの大きさが、全体の効率を低下させてしまっていた。

近年藤田らは結晶スポンジ（Crystalline Sponge; CS）法を用い、天然物の構造決定に必要な試料量が何桁も減らせることを示してきた。しかしながら、先行研究では分析対象の天然物が依然大量の生体試料から単離精製を行なうことで得られており、天然物構造決定のワークフローにおいて十分なスケールダウン効果をもたらされたとは言えなかった。また、多大な労力をかけて試料を単離したのち、CS法による構造解析に頓挫する場合も多々見られた。

本研究では、単離精製に先立ち化合物のCS法適合性を評価する実験系の構築を行なった。つぎに、CS法の適用範囲を拡張すべく、複数のステロイド化合物をモデルとして用いて新たな結晶試料作製条件を探索した。その結果、これまで積極的に利用されてこなかった極性溶媒がCS法における解析成功率を向上することを見出した。さらに、天然物化学の最先端トピックである遺伝子情報に基づく生合成研究をCS法の活用を前提として行い、従来よりも効率的に化合物の構造解析を行なった。これらの実証実験を通じ、本研究はCS法が天然物化学の新たなワークフロー確立に有効であることを明らかにした。

第二章では、必要試料量を大幅に減少させる天然物構造決定の新たなワークフローを確立するため、単離精製・構造解析に先立ち抽出エキス中の各成分とCS錯体との親和性を確認することでCS法により構造解析できる天然物、および適切な包接条件を効率的に判別する手法（以降、この操作を「CS法適合性スクリーニング」と称する）を考案した（図1A）。そして、このワークフローに基づき、実際に共同研究者から提供を受けた紅藻*Laurencia pacifica*の抽出エキス約10 mgに含まれる各種成分の構造決定を行なった。先行研究ではgスケールの抽出エキスから構造解析が始まっていることを踏まえれば、ここから構造決定を達成することで従来より100分の1から1000分の1のスケールダウン効果を主張できることになる。

まず、本抽出エキスを用いてCS法適合性スクリーニングを行なった。HPLC-UV分析によって、抽出エキスが成分a-iの9個から構成されていることを確認した（図1B 赤線A）。これらの成分とCS錯体との親和性を評価し、CS法による構造解析に適した成分を迅速に探索するため、CS錯体の単結晶に抽出エキスを吸収させた。抽出エキス25 µgを含む溶液にCS錯体の単結晶5粒を浸潤させ、その後結晶を取り出しシクロヘキサンに静置することで、CS錯体に吸収された成分を逆抽出した。逆抽出成分のHPLC-UV分析を行ったところ、逆抽出後においても6成分（成分a, b, c, e, g, i）の残存が確認され、これらの成分は結晶スポンジ法による構造解析に適すると示された（図1B 青線B）。一方で成分d, f, h

は包接後にピークが消失し、今回の包接条件ではCS錯体との相互作用が弱いことが示された。以上の結果を踏まえ、成分**a, b, c, e, g, i**の構造解析は今回の包接条件を用いてCS法によって行えるものと判断した。

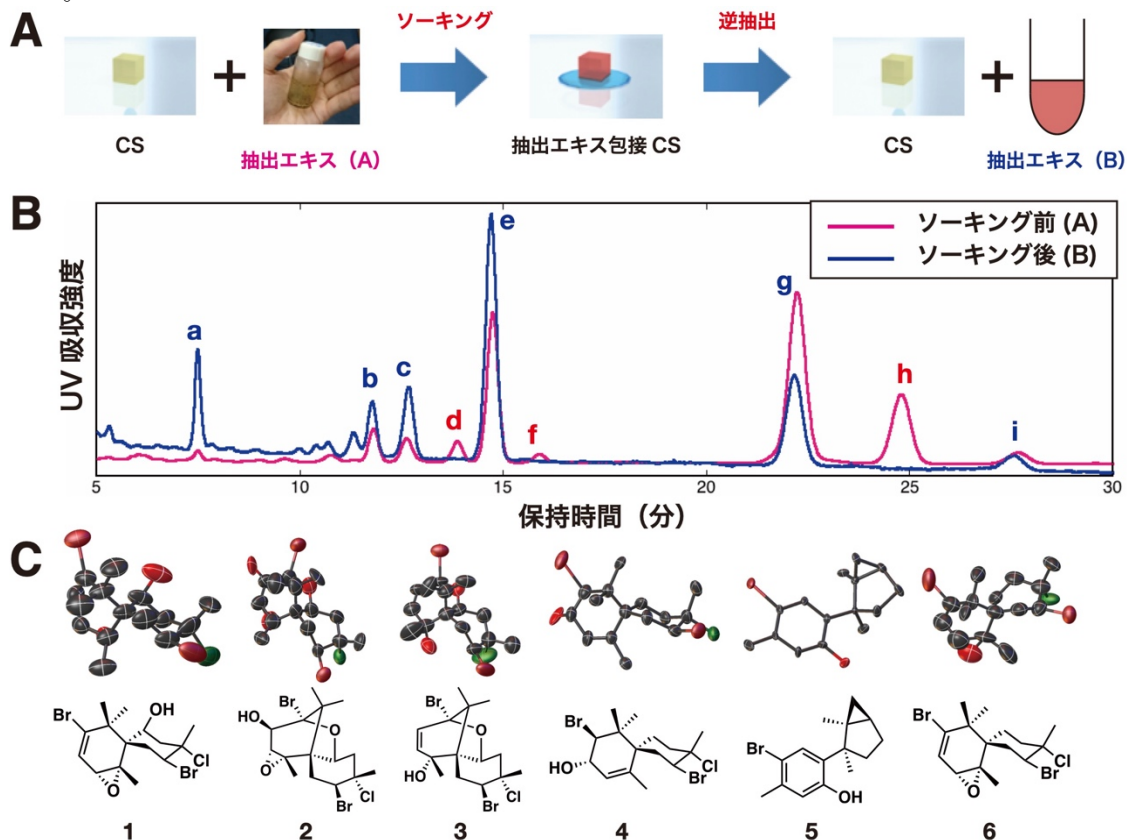


図1 (A) CS法適合性スクリーニングの手順. (B) *L. pacifica*抽出エキスとその逆抽出エキスのHPLC-UVクロマトグラム. (C) 化合物**1-6**の結晶構造 (ORTEP with 30% probability).

成分**a, b, c, e, g, i**を、あらためて抽出エキス10 mgからHPLCにより分取精製した。その後NMRとMSを併用してCS法による構造解析を行い、6個の既知化合物**1-6**の絶対構造を得ることができた (図1C)。このうち3個の絶対配置は先行研究で誘導体から推測されているに過ぎなかったが、本研究ではこれらについても初めて絶対構造を得た。

ステロイドは構造多様性と各種生理活性を示す天然物の一種であるが、複数の不斉点があるなど化学構造が複雑であるため、その正確な構造決定は困難を伴う。CS法はステロイドの構造解析ワークフローを改善することが期待されたものの、モデルとして用いたステロイド化合物cholesterol (**7**)はCS細孔内でディスオーダーを示し当初信頼性の高い構造解析結果を与えなかった。第三章では、改めて試料調製条件を再検討し、従来CS法に不向きとされていた極性溶媒 (アセトン、ブタノン等) がゲスト化合物のCS錯体内でのオーダーを促進することを見出した。さらに、極性溶媒を活用したCS法によって、互いに構造の似通った3個のhydroxycholesterol異性体や、実際に天然物化学の現場で得られた未知ステロイド化合物の立体配置解析を効果的に達成した (図2)。

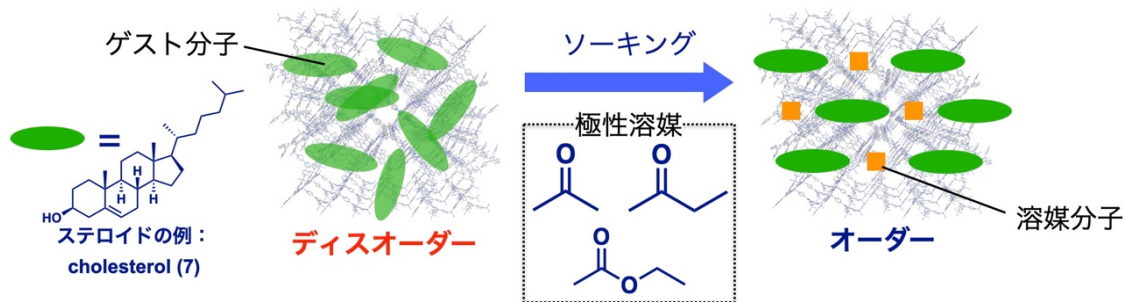


図2 極性溶媒を活用したCS法によるステロイドの構造解析.

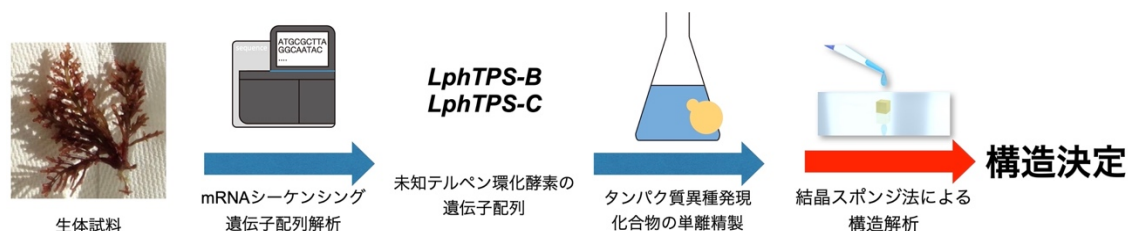


図3 本研究が提唱する、CS法を組み込んだ遺伝子情報に基づく生合成研究のワークフロー. NMRやMSに先立ってCS法による構造解析を行い、実験系のスケールダウンや構造解析の迅速化を狙った。

近年の遺伝子解析技術の発展は、天然物化学における生合成酵素の探索と発見を容易にした。一方で、生合成酵素産物の構造解析には多量のサンプルを要する核磁気共鳴(NMR)分光法や限定的な構造情報しか与えない質量分析(MS)法が依然主として用いられているため、生合成研究において酵素産物の構造解析が困難となる場合も多くある。第四章では、CS法を生合成研究に応用し、酵素産物を迅速に構造解析することを試みた(図3)。前述した紅藻*L. pacifica*に由来するmRNA配列より取得したテルペン環化酵素LphTPS-Cは、出芽酵母を用いた異種発現系において微量の未知テルペノイド**8**(総収量0.1 mg)を産生した。**8**は取得量がわずか、非結晶性、揮発性といった性質から、CS法における構造解析が最適と判断された。**8**を単離精製したのちCS法による構造解析を行ったところ、新規化合物haraldolの化学構造が見出された(図4)。NMRで構造解析を行うと、CS法の結果と矛盾しない平面構造が得られた。NOESY NMRスペクトル測定においては試料量が僅かであったため立体配置解析を行うために十分なシグナル強度が得られなかった。従来生合成研究のワークフローでは化合物の立体配置解析を行うにはNOESY NMRスペクトルの取得は必須であったが、本研究では既にCS法で絶対配置を決定できていることから、これはもはや問題とはならなかった。また、NMR解析の最中に偶然生じた分解物の化学構造もわずか0.1 mgの試料から決定できた。

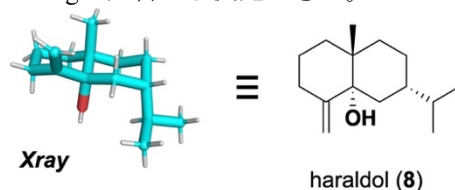


図4 紅藻*L. pacifica*由来未知テルペン環化酵素産物であるharaldol (**8**)の結晶構造および化学構造式.

このように、第四章では、天然物化学の最先端分野である遺伝子情報に基づく生合成研究において、CS法を構造解析における第一選択手法として採用し、新規非結晶性天然物の構造解析を迅速に達成した。本研究は、CS法を用いた天然物化学の新しい構造解析ワークフローが、NMRやMSに依存した従来のワークフローでは手に負えないような微量・揮発性・非結晶性天然物試料にも効果的であると示す好例となった。

本博士論文では、CS法の活用を前提として天然物化学のワークフローを刷新した。CS法適合性スクリーニングでは、単離精製に先立ちCS法で構造解析を効率的に行える化合物を容易に判別できる。CS法の活用を前提として天然物単離抽出の工程を開始すれば、必要な生体試料量がおよそ100分の1から1000分の1までに削減される。また、CS法において極性溶媒がゲスト化合物の配向を促すことを見出し、従来の試料調製条件よりも高い信頼性をもってステロイドの立体配置を含めた構造決定を達成した。そして、CS法を遺伝子情報に基づく生合成研究における構造解析に応用し、限られた培養試料から得られるわずかな単離試料からでも迅速かつ信頼性高く新規化合物の構造決定ができることを示した。