

論文の内容の要旨

論文題目 結晶スポンジ法を用いた天然物の絶対立体配置の決定

氏 名 李 鐘光

2013年当研究室は結晶化を必要としないX線構造解析手法である結晶スポンジ法を報告した。多孔性を有するネットワーク錯体の単結晶(結晶スポンジ)に試料溶液を染み込ませると、試料は細孔の中でホストを鋳型とする周期配列を形成し、試料分子のX線構造解析が可能となる。したがって、これまで不可能であった結晶性に乏しい分子(例えば液体)の結晶構造を取得することができる。また、結晶スポンジは1 μg 程度であることから、必要な試料量はng \sim μg スケールで十分である。さらに、結晶スポンジが有する重原子の効果を用いた絶対立体配置の決定を可能とし、これまで様々な有機分子の構造を明らかにしてきた。

一方、天然物は強力かつ幅広い生物活性を与えることから、創薬ターゲットとして大変魅力的である。しかし、天然物は取得量が少なく、また構造が複雑であるため、既存の方法では、単離された構造未知天然物の構造決定は難しく、特に単結晶の取得が困難であることから、絶対立体配置の決定は非常に難しい。

本博士論文では、構造未知の海洋天然物やゲノムマインニングにより取得された新規の非天然型天然物に着目し、結晶スポンジ法の特徴を最大限に活用することで、それら新規天然物の構造を明らかにすることを目的とした。また、構造未知天然物に対し、構造解析の初期段階から結晶スポンジ法とNMRを相補的に用いることで、迅速かつ高信頼性の新規構造解析ワークフローの確立を目指した。

本論文は以下の7章から構成されている。以下に詳細を述べる。

第1章では、本研究の背景、目的、及び概要を論じた。結晶スポンジ法の詳細、及び結晶スポンジ法を用いた今後の可能性に関してまとめた。

第2章では、海洋天然物である **Elatenyne** の絶対立体配置の決定研究を論じた。**Elatenyne** は1986年に海洋植物から単離された油状天然物である。NMR解析やDFT計算、合成研究の結果、母骨格としてビス(2,2'-テトラヒドロピラニル)構造を有する、一組の鏡像異性体が提唱された。その後、全合成が達成され、その構造スペクトルデータが単離品と良く一致したことから、**Elatenyne** の相対配置が決定された。ところが、全合成された **Elatenyne** の比旋光度 $[\alpha]_D$ はほぼ0の値を示した一方、2度単離された **Elatenyne** の $[\alpha]_D$ 値はそれぞれ正・負両方の値が報告されていたため、絶対配置に関しては結論を導き出すことができなかった。そこで、おそらく唯一の解析手法であろう結晶スポンジ法により、絶対立体配置の決定を行った。

単離 **Elatenyne** (10 μg)を50°C, 2日間の条件で、結晶スポンジへ染み込ませ、得られた複合体をX線結晶構造解析した結果、ゲスト分子のモデル構築に成功し、その相対配置は提唱された構造と一致した。空間群がC2に変化し、Flackパラメータの値が0.071(7)に収束したことから、絶対配置の決定も達成した。本結果は、結晶スポンジ法を用いた初めての微量天然物の絶対立体配置の決定であり、30年間不明であった **Elatenyne** の絶対立体配置を明らかにすることに成功した。

第3章では、海洋天然物である **Cycloelatanene A**, 及び **B** の絶対立体配置の決定研究を論じた。両化合物はUrbanらにより、海洋植物から単離された油状天然物であり、NMRを用いた構造解析により、5つの不斉炭素原子を有し、高度に縮環した化合物の2種のC4エピマー体であると帰属された。しかし、いずれも単結晶が得られず、また合成研究に関する報告はなく、絶対立体配置は未決定であった。そこで、結晶スポンジ法を用いた **Cycloelatanene A**, 及び **B** の絶対立体配置の決定を行った。

Cycloelatanene B (5 μg)を50°C, 1日間の条件で、結晶スポンジへ染み込ませ、得られた複合体をX線結晶構造解析した結果、ゲスト分子のモデル構築に成功し、空間群はC2、Flackパラメータの値は0.033(5)を与え、**Cycloelatanene B** の絶対配置を決定することができた。この構造解析において、C4位の立体配置がNMR解析で帰属された相対配置とは一致しなかった。同様に、**Cycloelatanene A** についても結晶スポンジ法による構造解析を行ったところ、やはりC4位の立体配置がNMR解析結果とは逆に帰属されていた。そこで、両化合物について、NOEデータの詳細な再解析、及び二面角とカップリング定数の相関を精査した。その結果、いずれもX線解析から導かれた構造を支持するものであった。以上より、結晶スポンジ法を用いた **Cycloelatanene A**, 及び **B** の相対配置の改訂、及び絶対配置の決定を達成した。

第4章では、植物由来の天然物である **Fuliginone** の構造決定研究を論じた。オーストラリアの植物から単離された **Fuliginone** はNMR研究により2-フェニルフェナレン-1-オンであると同定・論文発表された。しかし、構造検索の結果、当該構造は合成既知化

化合物であり、しかもそれらのスペクトルデータは一致しないことが明らかとなった。そこで、結晶スポンジ法を用いた **Fuliginone** の構造解析研究を行った。

単離 **Fuliginone** (5 μg) を 50°C, 1 日間の条件で、結晶スポンジへ染み込ませ、得られた複合体を X 線結晶構造解析した。その結果、フェナレノン骨格はモデル化できたものの、フェニル基が存在する領域に電子密度残渣が観測されなかったことから、単離 **Fuliginone** は 2-フェニルフェナレン-1-オン構造ではないと考察し、単離品の再精製、及び NMR の再解析を行った。その結果、2 位はフェニル基ではなく水酸基であると推定され、本情報を再度 X 線データにて精査することで、その構造を 2-ヒドロキシフェナレン-1-オンであると結論づけ、構造改訂に至った。

第 5 章では、非天然型天然物である **Astellifadiene** の絶対立体配置の決定を論じた。近年、合成生物学の分野では、機能発現を抑制されている合成酵素の遺伝子配列を探し出し、強制発現させることで新しい代謝経路を見出すゲノムマインニング研究が注目を集めている。**Astellifadiene** は阿部らによりゲノムマインニングを経て生産された新規セスタテルペンである。相対配置は NMR 解析により決定されたが、油状化合物であること、誘導体化やフラグメント化が困難であることから絶対立体配置の決定には至らなかった。そこで結晶スポンジ法を用いた絶対配置の決定を行った。

Astellifadiene (10 μg) を 50 °C で 2 日間静置した後、4 °C で 9 日間ゆっくりと溶媒除去することで、結晶スポンジへ染み込ませた。得られた複合体を X 線結晶構造解析した結果、ゲスト分子のモデル構築に成功し、観測された相対構造は NMR 解析結果と一致し、さらに空間群は **C2** に変化し、**Flack** パラメータの値は **0.071(6)** を与えたことから、**Astellifadiene** の絶対立体配置の決定を達成した。

今回、ホスト由来の重原子効果を利用することで、炭化水素化合物 **Astellifadiene** の絶対立体配置を一切の化学的変換を用いることなく決定することができた。

第 6 章では、構造解析の新しいワークフローとして、NMR 併用結晶スポンジ法の確立を論じた。これまで X 線結晶構造解析は NMR 等の解析を十分行った後に、もしくは構造解明に至らなかった場合の手法であり、後回しになっていた。これは単結晶の作製には非常に時間を要することが主な理由であるが、結晶スポンジ法はその欠点を解消できる。そこで本研究では、構造解析開始時から結晶スポンジ法を他の機器分析と並行して行うことで、その併用手法が構造解析フローに与える効果を検証することとした。

Weng らにより海洋植物から単離された構造未知天然物であるセスキテルペン **A** を用い、実験を行った。検討開始時の構造情報は、質量分析より得られた分子式 **C₁₅H₂₄** のみであった。**A** (5 μg) を 50 °C、2 日間の条件で結晶スポンジへ染み込ませ、得られた複合体を X 線結晶構造解析した結果、化合物の包接に成功し、強い 12 個の炭素原子

ピークを見出した。しかし、残る 3 つの炭素原子に関しては、周辺の電子密度残渣が実在のピークか、人為的に選択したピークか、判別がつかなかった。これ以上の解析には束縛条件を用いた慎重な解析が必要であり、可能ではあるものの、誤った構造情報を導く可能性が懸念された。

一方、並行して行った NMR 解析の結果、4 つの部分構造を導いた。しかし、これ以上の解析には重なり合ったシグナルから結合様式を推論し、また NOESY による距離情報から相対配置を決定しなければならず、X 線構造解析と同様、可能ではあるものの、誤った解釈を与える懸念があった。

そこで、単独の構造情報で推し進めることは危険であると判断し、解析初期段階で得られた確度の高い構造モデルを組み合わせることで、解析を進めた。その結果、X 線データ上の残る 3 つの炭素原子をアサインすることができ、5-4-5 環を有する初期モデルを構築することに成功した。続く最小二乗法を用いた精密化解析により計算は収束し、Flack パラメータの値が 0.057(6)を与えたことから、A の絶対立体配置を決定することができた。

最後に本構造は、COSY 及び、HMBC データを改めて解析した結果と矛盾なく、かつ NOESY 測定から得られた NOE 相関とも矛盾しないことが確認できたことから、これをもって構造未知天然物 A の絶対構造決定を達成した。

このように、NMR データと結晶スポンジ法データを相補的に組み合わせることで、曖昧さを含む解析工程を一切排除した、おそらく最も信頼性の高いワークフローの確立に成功した。

第 7 章では本研究を総括した。

結晶スポンジ法の特徴を最大限に活かし、既存の方法では非常に困難な、もしくは不可能である構造未知天然物の絶対立体配置の決定を達成した。特に、合成生物学を用いた手法により、新規の非天然型天然物の生産が加速すると予想される中、律速段階になり得る構造解析研究段階を飛躍的に加速する結果を得た。

また、NMR 併用結晶スポンジ法という新規構造解析ワークフローを提唱し、天然物のみならず、あらゆる分子の構造解析をより迅速、かつ高い信頼性の下に行える可能性を示した。

今後、本研究を基にして、枯渇の一步を辿る天然資源の再供給を活性化し、かつ得られた新規化合物をリードとした創薬研究へと応用することで、天然物化学の更なる発展に貢献したい。