

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05408

研究課題名(和文) 中分子の天然物に対する結晶スポンジ法の適用法開発

研究課題名(英文) Development of a method to apply the crystalline sponge method to medium-molecular-weight natural products

研究代表者

木村 智之 (Kimura, Tomoyuki)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：40462270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中分子天然物の絶対立体化学を迅速に決定すべく結晶スポンジ法の適応方法について検討した。分子量1000を超える天然物を用いて検討を行ったが、そのままではソーキングが困難であり、分解及び誘導化する必要があった。分解物での測定結果から分子量400から500前後で結晶スポンジへのソーキングが困難になってくる傾向があった。

本研究課題で行った実験結果から1級及び2級水酸基に保護機の導入、分解反応により分子量400前後の誘導体にし、対象物が結晶スポンジの中心付近までソーキングされるよう、Lab機で測定可能な範囲内で、できるだけ小さな結晶スポンジを用いる事により構造決定が可能になると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中分子天然物の絶対立体化学を含めた構造決定は、活性発現、作用機序解明、構造か性相関研究、そしてそこから創薬研究につながる一番初めの重要なステップである。しかし、絶対立体化学の決定は多大な労力と時間を要する。そこで、迅速な構造決定方法が求められている。今回の方法は、対象化合物を結晶化することなくX線結晶構造解析で構造を決めることができる手法であり、大きな期待が寄せられている。分子量1000を超える天然物を用いて解析を行った本研究課題の結果を用いる事で、今後、中分子天然化合物をどのように誘導化すればソーキングできるか参考になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I investigated a method for rapidly determining the absolute configuration of medium-molecule natural products using the crystalline sponge method. Experiments were performed using natural products with molecular weights of over 1000, but soaking was difficult. It was necessary to decompose and derivatize the natural products. The measurement results showed that soaking into the crystalline sponge tended to become difficult at molecular weights of around 400 to 500. The experimental results of this research project revealed the following: Introduction of protective groups to primary and secondary hydroxyl groups. Decomposition reaction produces derivatives with molecular weights of around 400. A small crystalline sponge is used.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物 X線結晶構造解析 結晶スポンジ法 中分子化合物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年創薬のターゲットとして分子量 500 から 2000 前後の中分子が注目されている。『中分子』の定義は分子量だけであり、この範囲に入る天然物、糖鎖、ペプチドなど様々な化合物が含まれている。ペプチドや核酸、核酸誘導体については各製薬企業が特に注目している。天然物では、例えばクロイソカイメンから得られたハリコンドリノ B をリード化合物とし、抗がん剤がつけられている。天然物にはこれ以外にも魅力的な化合物が多数存在している。しかしながら、放線菌培養液や海洋から得られる天然物で分子量 500 から 2000 前後の化合物は、複数の不斉中心を有していることが多く、その絶対立体化学の決定には膨大な時間と労力を必要としている。創薬分野で天然物の利用は進んでいない理由の一つに思われる。

機能解析や構造活性相関研究を展開しようとした際、その化合物の絶対立体化学が決まっていなければ、正確な知見を得ることができない。絶対立体化学を含めて構造決定することが、機能解析、構造活性相関をはじめすべての研究の第一歩である。絶対立体化学の決定を迅速に行う手法が必要と考えている。

そこで、結晶スポンジ法に注目した。結晶スポンジを用いて放線菌培養液や海洋から得られる中分子天然物の絶対立体化学を決定するべく本研究課題を提案する。

### 2. 研究の目的

新規中分子天然化合物の絶対立体化学を迅速に決定することは、生命化学、合成、創薬等の分野の研究につながり、その後の科学的展開に大いに寄与する。本研究課題の目的は、新規中分子天然物の絶対立体化学の決定を迅速に行うことを目的としている。

手法としては、結晶スポンジ法を用いる事を考えている。結晶スポンジ法を使って構造を決定することと、一般的な X 線結晶構造解析の違いは、結晶化の必要がないという点であるが、最適なソーキング方法を見出す必要がある。ソーキング法は、ある程度一般化されつつあるが、対象化合物の特性等に合わせて検討する必要がある。本研究課題を遂行するにあたり、主な大きな問題点は下記の点である。

結晶スポンジにソーキングできる化合物の大きさの問題がある。すなわち結晶スポンジの各格子の大きさと対象分子の空間的な広がりとの関係である。これについては、いまだに正確な数字がだされていない。近年の研究報告では、結晶スポンジの中心金属の亜鉛と窒素との結合が予想以上に伸縮している事が判明している。そのため、本課題のように空間的に大きな広がりを持っているような中分子天然物のソーキングを試みる場合、慎重に検討する必要がある。ソーキングできないサイズの場合は、何かしらの手法により中分子天然物を分解し最適なサイズにする必要があると考えられる。

また、結晶スポンジのポケットが疎水性のため、1 級、2 級水酸基がある化合物については、ソーキングが困難な場合があることが知られている。さらに中心金属の亜鉛と相互作用してしまうような求核性の化合物はソーキングできないとされている。そこで必要に応じて天然物に対し、保護基を導入するなど誘導化反応を行う必要がある。

以上の点から、ソーキングできる天然物の空間的な大きさの傾向、並びに水酸基を多く含むような天然物での保護基の導入とソーキングの傾向を調べることで、結晶スポンジ法で中分子天然物の解析する手法の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、中分子の天然有機化合物に対し結晶スポンジ法を適用しその絶対立体化学を決定する手法の確立を目的としている。そのために中分子天然物の例として大環状マクロライド化合物 Quadoctomycin と糖を含んでいるテルペン化合物 wychimicin を用いて研究を行うことにした。

初めに中分子天然物にたいして保護基の導入など誘導化を行わずにソーキングを試みる。ソーキングの検討項目としては、溶媒、溶媒量、温度、揮発スピードなどである。小分子での実験ではエバポレーター/アスピレーターを使用することで、速やかにソーキングされる例があり、本物質に関しても検討事項に入れ、汎用性の高いソーキング法の確立を目指す。

次に中分子天然物の水酸基に対し、保護基の導入を試みる。水酸基の保護基としては、アセチル基やメチル基を検討する予定だが、分子の大きさ等からメチル基を優先的に考えている。結晶スポンジにソーキングさせることが目的のため、すべての水酸基にメチル基を導入する必要はないと考えている。そして、保護基の有無で充填率を比較し、保護基の必要性を明らかにする。

上記の検討の結果から中分子天然物の誘導化が必要と判断された際には、保護基導入、マクロラクトン環の開環反応、酸化開裂等の反応を行い、サイズダウンしてソーキングを試みる。

希少天然物への応用のために、結晶スポンジへの取り込み率も明らかにする計画である。

#### 4. 研究成果

##### 大環状マクロライド化合物 Quadoctomycin について

誘導化を行わずにソーキングを試みた。対象の天然物がヘキサンやシクロヘキサンに対する溶解性が悪かったため少量のクロロホルムを用い、溶解させた。温度、揮発スピードなど詳細に検討を行ったが、良好な結果は得られなかった。ソーキングできていないか、結晶スポンジを壊してしまう結果であった。

次に、保護基の導入を検討した。本化合物には 21 個の水酸基があり、そのすべてに保護基を導入するべく反応を行った。得られた誘導体についてソーキングを検討した。しかし、どの条件も結晶スポンジを壊してしまう結果になった。

そこで、保護基がかかった誘導体をさらに分解反応を行った。分解反応で得られたフラグメントについて、結晶スポンジ法を適用している。この結果から、ソーキングに適した分子の大きさが判断できるのではないかと考えている。

##### 糖を含んでいるテルペン化合物 wychimicin

誘導化を行わずにソーキングを試みた。対象の天然物がヘキサンやシクロヘキサンに対する溶解性が悪かったため少量のクロロホルムを用い、溶解させた。温度、揮発スピードなど詳細に検討を行った。室温以下で、時間をかけたソーキングで、占有率は低いもののテルペン化合物の骨格の一部を考えられる電子密度を確認することができた。占有率を上げるため 0 度から 12 度までの温度範囲で詳細に検討を行ったが、改善することはなかった。

糖部分の加水分解を行いアグリコン部分のみでソーキングを試みた。アグリコン部分には、2 級水酸基が 2 つのみであり、ソーキングできる可能性があると考えた。室温以下の条件で時間をかけてソーキングが有効であった。X 線結晶構造解析を行うと、絶対立体化学を検討するためには熱量が大きく、さらに条件を検討する必要がある。

測定方法の検討として結晶スポンジを切断して小さくする方法や、microED の活用について検討した。

切断して小さくして測定する発想は、結晶スポンジの中心付近までソーキング対象化合物が浸透していないことがわかったか、浸透している外側だけで測定することで、構造解析できるのではないかと考えたからである。結晶スポンジを劈開し、顕微鏡観察するとひび割れもなく問題無く X 線を測定できると判断で来たが、実際に X 線を当てると、良好な反射を観測することができなかった。これは、目では確認できないひび割れなどがあると考え、より細かくし microED で測定を行うことにした。microED の測定を行ったところ、解析できるほどの電子線回折を得ることができなかった。これは、測定用粉末サンプル調製中あるいは測定中に結晶スポ

ンジが壊れる事によると考えている。結晶スポンジを劈開あるいは粉末化し X 線や電子線で解析するのは困難であると結論づけた。

結晶スポンジの中心付近までソーキングするためには、小さい結晶スポンジを用いるのが有効と考えている。

これまでの結果から中分子天然化合物について、1 級及び 2 級水酸基の保護、分解反応により分子量 400 前後の誘導体にし、Lab 機でも測定可能な範囲内で、できるだけ小さな結晶スポンジを用いる事で構造決定できると考えている。以上の結果を基に論文化を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物化学研究所webページ  
<https://www.bikaken.or.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------