

令和元年5月1日発行(毎月1回1日発行) 通巻816号 昭和15年4月18日第3種郵便物認可 CODEN:KAKYAU ISSN 0451-1964

C H E M I S T R Y

# 化学

MAY  
2019  
Vol.74

5

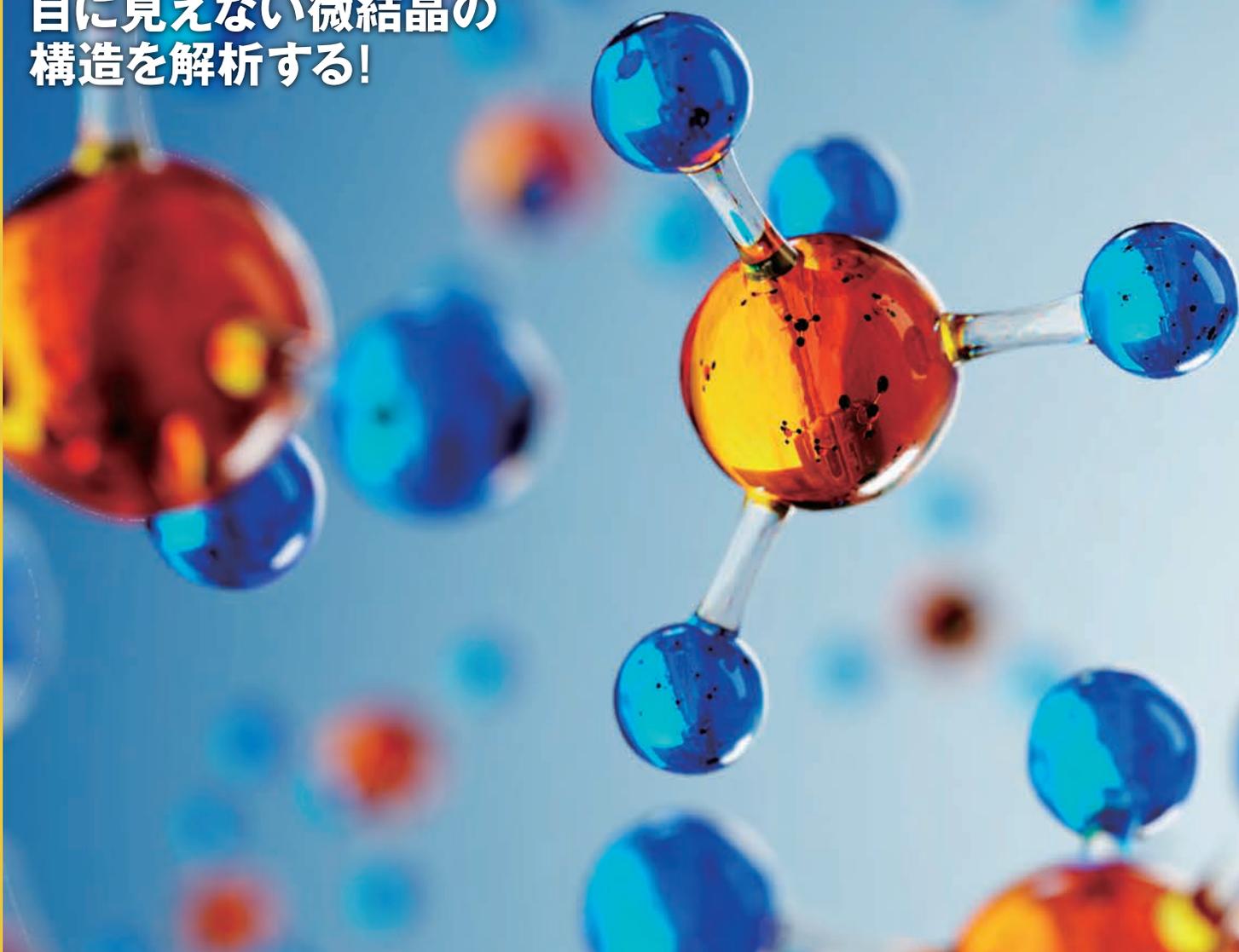
特集 • Special issue

## 平成の化学キーワード

この30年間の化学研究を振り返る

解説 • Review

目に見えない微結晶の  
構造を解析する!



# 目に見えない微結晶の構造を解析する！

## — マイクロ電子回折で三次元分子構造を決定

原野幸治・劉 東欣・中室貴幸・中村栄一

東京大学大学院理学系研究科

**目**にも見えない微結晶を用いて分子構造を決定するための簡便な手法が誕生した。透過電子顕微鏡によるマイクロ電子回折である。化学論文には結晶構造が必須、という時代が到来しそうである。

### 研究を加速させる夢の構造解析法！

X線結晶構造解析は、有機化学者にとって今や必要欠くべからざる構造解析法である。最近では自動化も進み、昼間のうちに単結晶をつくっておけば、次の朝には分子の三次元立体構造が決まる。しかし、問題は単結晶の作製である。やっと目に見えるかどうかの微小な結晶しか与えない化合物も多く、したがって結晶構造がないと論文が通らないということはない。

しかし、ここに従来の常識を覆す方法が現れた。透過電子顕微鏡(電顕)を用いたマイクロ電子回折(マイクロED)によって分子の三次元構造を決定する手法であり、1  $\mu\text{m}$ ほどの目にも見えない粉末微結晶を使って結晶構造を決定できる。実はこの手法は、タンパク質の構造解析法としてよく知られていたが、これが有機および無機の低分子の三次元結晶の構

はらの・こうじ ● 東京大学大学院理学系研究科特任准教授、2007年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了、<研究テーマ>電子顕微鏡を駆使した分子集合体科学の探究

リュウ・トウキン ● 東京大学大学院理学系研究科修士課程、<研究テーマ>電子顕微鏡を用いた化学反応の解析

なかむら・たかゆき ● 東京大学大学院理学系研究科特任助教、2018年京都大学大学院工学研究科博士課程修了、<研究テーマ>有機金属化学、電子顕微鏡化学

なかむら・えいいち ● 東京大学大学院理学系研究科特任教授・名誉教授、1978年東京工業大学大学院理工学研究科博士課程修了、<研究テーマ>有機化学

造解析にも応用できることが、2018年10月にスイスとアメリカの2か国から同時に発表された<sup>1a,2)</sup>。一つの微結晶を用いて数時間で三次元構造が決まるばかりか、水素原子の位置さえも容易に決められ、結晶の混合物でもそのまま解析できるので、市販のカプセル剤や散薬の中身もわかる。また、有機物の電子回折では化合物の分解を防ぐために極低温が必須とされてきたが、今回の報告では室温でさえも良好な結晶構造が決定できることが示された。

このように、これまでの結晶構造解析にない幾多の特徴をもち、日常的な研究を大きく加速する可能性があることから、今後、有機化学者のルーチン的な構造解析法となるであろう新手法である。核磁気共鳴(NMR)スペクトルと同様に、マイクロEDによる結晶構造データがないと論文が通らないという時代が早晚到来することも予見させる。これまで縁遠いと思われていた有機・無機化学と電子顕微鏡の距離が一気に近づきそうな情勢である。

### 電子線結晶構造解析とは

X線結晶構造解析は、結晶体の周期構造が回折格子として働くことで起こる現象であり、試料の電子雲によって散乱されたX線を観測することで、結晶中の電子の分布、つまり結晶内の原子の三次元配置を知る手法である。しかし、X線と電子の相互作用が小さいために大きな結晶を必要とする点がネックであり、微小な結晶しか得られない場合は放射光施設での測定が必要となる。これに対して電子線結晶構造解析は、電子の波動としての性質を利用して、結晶中の原子核と電子の相互作用によって生じる回折パターンから結晶格子を決定する手法である。電子線はX線に比べて10万倍も強く試料に散乱されるため、微小な結晶からでも高い空間分解能

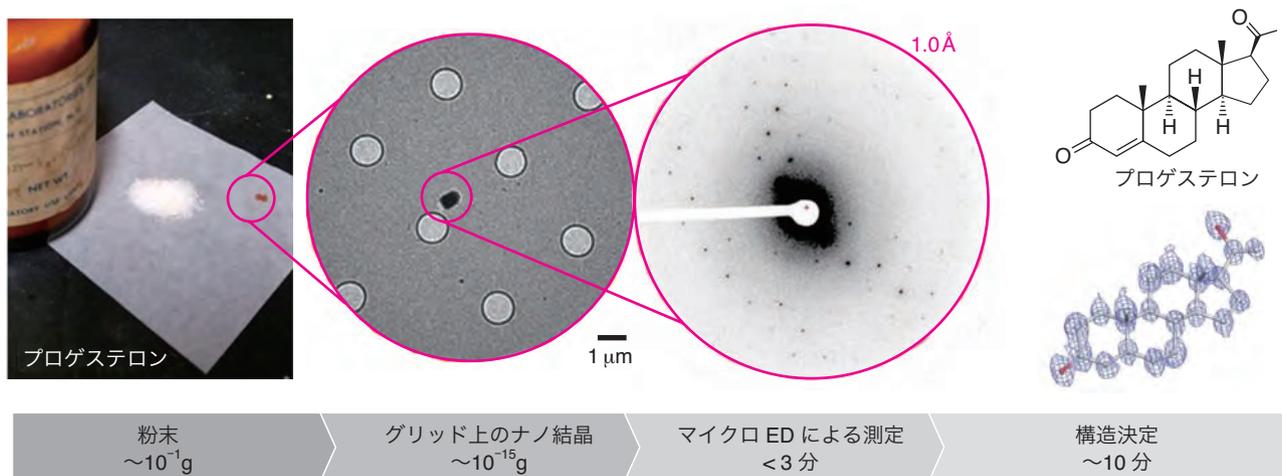


図1 プロゲステロンの電子回折による構造決定の流れ

C. G. Jones et al., *ACS Cent. Sci.*, **4**, 1587 (2018) より転載し、一部改変。©2018 American Chemical Society.

で回折点を測定できるという特徴がある。この特徴を生かして、タンパクの結晶構造解析への応用が広く行われており、日本の研究者がその先端を切り拓いてきた<sup>3,4)</sup>。

一方で、電子線と試料の相互作用が強く、試料分子が分解してしまうのを防ぐために液体窒素温度で測定する必要があるとともに、電子回折では多重散乱が起こるので解析が難しいなどとされてきた。そのため低分子の三次元結晶を取り扱う化学の世界ではもっぱら X 線結晶構造解析が用いられ、電子線結晶構造解析はまったく行われていなかった。透過電顕が化学者にあまり馴染みのない研究機器であることもその理由の一つだった。

### マイクロ ED 結晶解析の原理と利点

このような状況下、昨年 10 月に、スイスとアメリカの研究グループがそれぞれ独立に、電子回折法によって大きな結晶を準備することなく分子の構造決定が可能な手法を報告した<sup>1a,2)</sup>。実際のところ、先述したようにマイクロ ED はタンパク質分野では既知の手法だったので、この研究成果は「コロブスの卵」というべきものだ。「微結晶の構造決定ができなくて困っている」という有機化学者の悩みを聞いたタンパク質の電子回折の専門家が、「そんなの簡単だよ」と答えたというわけである。

図 1 に示すとおりやり方は単純、そこらにある微結晶を一つ、電顕用のグリッドに載せ、そこに電子線を照射して得られた回折パターンを解析するだけである。たとえば、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した化合物がそのま

ま構造決定できるので、NMR 分光法に取って代わるような構造解析手法になる可能性も大きい。アメリカのグループは液体窒素で冷却した試料ステージ上で構造解析をしているが、一方で、懸念された試料分子の分解もそれほど問題にならないことがわかり、スイスのグループは室温での測定でも良好にデータ収集ができることを報告している<sup>1b)</sup>。これは筆者のグループでも確認している。電顕で分子の構造を決定する手法としては、単一分子の配座変換や化学反応など動的観察のための SMART-EM 法<sup>5,6)</sup>があり、静的な構造解析であるマイクロ ED 法とは相補的な関係にある。両手法ともに同じ透過電顕装置で実施することが可能である。

電子回折を結晶構造解析に使うもう一つの強みは、化合物中の水素原子の位置を決定できることにある<sup>7)</sup>。先述のとおり X 線結晶構造解析は、電子雲と電磁波の相互作用に由来するため、水素原子に対して感度が悪い。しかし、電子回折は原

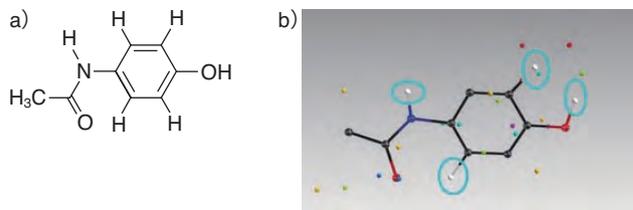


図2 アセトアミノフェンの構造解析

a) アセトアミノフェンの分子構造。b) 電子回折から求められた結晶構造。水色の円で示した水素原子の位置が決定できた。T. Gruene et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 16313 (2018) より転載。© T. Gruene et al., 2018. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

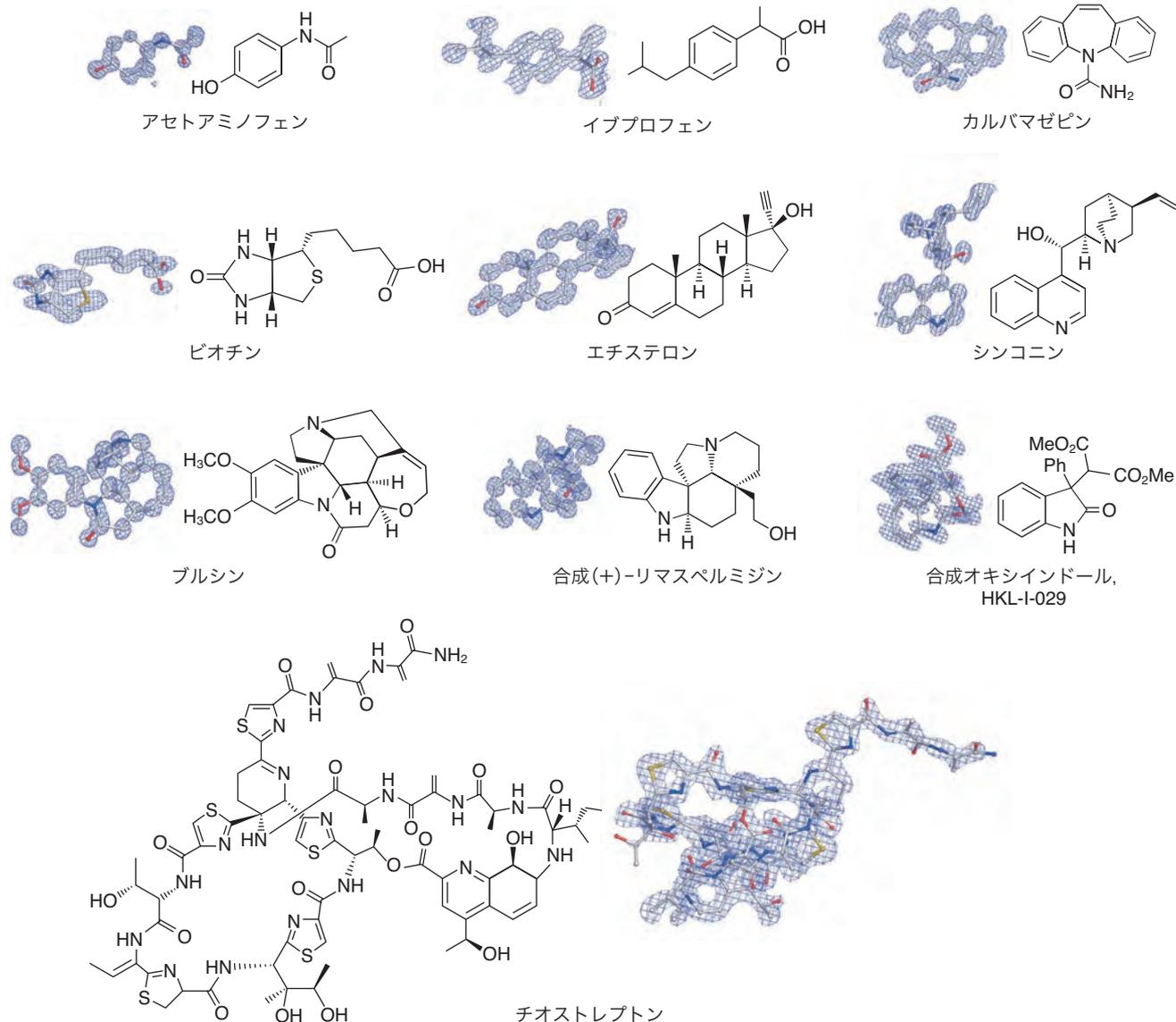


図3 ビタミン類、市販の天然物、医薬品化合物などさまざまな小分子の構造解析  
カルバマゼピンと合成(+)-リマスベルミジンの場合は、ほぼすべての水素原子の位置が決定できている。C. G. Jones et al., *ACS Cent. Sci.*, **4**, 1587 (2018) より転載し、一部改変。©2018 American Chemical Society.

子核と電子がつくる静電ポテンシャルを反映した構造解析であるため、水素の位置を高い精度で決定できる。図2にアセトアミノフェンの構造解析結果を示す。最初の構造最適化のサイクルで、すでに四つの水素原子の位置が決定されている。

### マイクロED法による実際の観察手順と結果

試料の作製はきわめて簡単である。直径3 mmの金属メッシュの上に薄いカーボン膜を張ったごく普通の電顕のサンプルグリッドに、構造決定したい化合物の微粉末の試料をほん

の少しまぶすだけである。X線結晶構造解析の場合は、十分な回折強度を得るためにサブミリメートルサイズの結晶が望ましいとされるが、電子回折ではむしろ目に見えるほどの大きな結晶は不適切である。顕微鏡を見ながらよい微結晶の一つを見つければ、あとは電顕の鏡筒内でサンプルステージを連続的に回転させ、CMOSカメラ<sup>\*1</sup>により連続的に回折パター

\*1 CMOS (相補性金属酸化膜半導体; complementary metal oxide semiconductor) を用いた撮像素子。従来の CCD (charge-coupled device) カメラに比べデータの読みだし速度が速く、連続撮影が可能などの特徴がある。

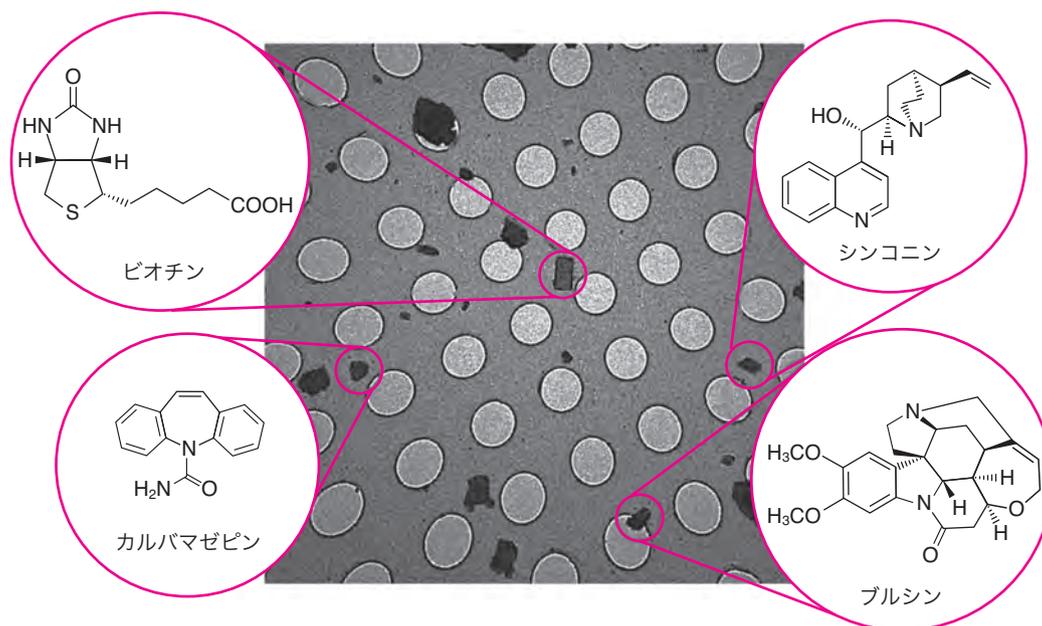


図4 マイクロED法による混合物中の結晶解析

4種類の有機化合物(ビオチン、カルバマゼピン、シンコニン、ブルシン)の粉末混合物を一つのグリッドに同時に載せて、それぞれの粉末微結晶から構造を解析した。C. G. Jones et al., *ACS Cent. Sci.*, **4**, 1587 (2018) より転載し、一部改変。©2018 American Chemical Society.

ンを取得することで、最速で3分あればデータ取得が完了する。その後データ処理を行うことで分子構造の三次元構造が得られる。測定開始から構造を得るまでにかかる時間は数十分から数時間であり、NMRなら、一つの化合物については、もう三次元構造がわかってしまっているということになる。アメリカのグループは数多くの小分子について構造解析

を報告しており(図3)、いずれの例についても0.9~1.1 Åの分解能で構造解析が達成されている。X線結晶構造解析には及ばないが、原子どうしのつながりを知るには十分な分解能である。

これまでの有機化合物の構造決定においては、試料をよく精製することが構造解析の出発点だった。しかしマイクロED法では、一つの微結晶があれば十分なので、混合物中の

## コラム

### ●プレプリントサーバとブログの威力●

ここで紹介した二つの論文が世にでた経緯は、昨今の学術出版界の変容ぶりを理解するための好例となった。昨年10月16日にスイスからの論文<sup>1a)</sup>が(論文査読を経て) *Angewandte Chemie* 誌でWeb公開されると、翌17日にアメリカからの論文<sup>2)</sup>がプレプリントサーバ ChemRxiv<sup>TM</sup> に投稿され、(査読を経ることなく)即日公開された<sup>3)</sup>。これを *ACS Central Science* 誌の編集長であるスタンフォード大学の Carolyn Bertozzi が即座に Twitter にポストしたことで情報が広まり、18日には *Science Translational Medicine* 誌の編集者が両論文の紹介記事をブログに掲載<sup>9)</sup>、さらに19日には *Science* 誌が速報として Web ニュース欄に取り上げた<sup>10)</sup> ことで多くの科学者に知

られるところとなった。最終的にアメリカからの論文が *ACS Central Science* 誌に受理、掲載されたのは11月に入ってからである。

以前の紙媒体による学術出版なら、アメリカの論文が世に知られるようになるのは翌年になり、これほど一気に情報が広がることはなかったに違いない。そもそも、内容があちこちにリークされている研究内容をトップジャーナルが論文採択することもなかっただろう。今回のケースのように、査読を経ないプレプリントサーバでの研究成果発表が果たす役割はますます大きくなる一方で、内容の正確さをいかにして担保するかが今後の課題でもある。

結晶を一つひとつ分析することも可能である。実際にアメリカのグループは、図4に示す4種類の化合物の粉末を混ぜて試料を作製し、結晶ごとの解析に成功している。



構造決定は、化学研究の一丁目一番地である。19世紀から1960年代に至るまで、有機化合物の分析といえば結晶性誘導体化と元素分析だった。そして、1970年代以後の主流はNMR分析である。NMR測定をしない有機化学や無機化学の研究室は、今や考えられない時代だが、「結晶がでた」らすぐさま電子線結晶構造解析にかけるという時代はいつ来るのだろうか。

本稿の執筆時点で論文発表から半年も経たないが、すでに、「マイクロEDで結晶構造を決めてはどうか」という論文審査意見が送られてきた。遠くない将来、マイクロED解析がないと論文掲載不可となる可能性さえもでてきたのである。日本でも適切な研究支援体制を早急に整える必要があろう。

#### 参考文献

- 1) a) T. Gruene, J. T. C. Wennmacher, C. Zaubitzer, J. J. Holstein, J. Heidler, A. Fecteau - Lefebvre, S. De Carlo, E. Müller, K. N. Goldie, I. Regeni, T. Li, G. Santiso - Quinones, G. Steinfeld, S. Handschin, E. van Genderen, J. A. van Bokhoven, G. H. Clever, R. Pantelic, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 16313 (2018). b) E. van Genderen, M. T. B. Clabbers, P. P. Das, A. Stewart, I. Nederlof, K. C. Barentsen, Q. Portillo, N. S. Pannu, S. Nicolopoulos, T. Gruene, J. P. Abrahams, *Acta Cryst.*, **A72**, 236 (2016). 2) C. G. Jones, M. W. Martynowycz, J. Hattne, T. J. Fulton, B. M. Stoltz, J. A. Rodriguez, H. M. Nelson, T. Gonen, *ACS Cent. Sci.*, **4**, 1587 (2018). 3) 藤吉好則, 化学と生物, **47**, 786 (2009). 4) K. Yonekura, K. Kato, M. Ogasawara, M. Tomita, C. Toyoshima, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **112**, 3368 (2015). 5) 岡田賢, 山内薫, 原野幸治, 中村栄一, 化学, **73**(4), 12 (2018). 6) E. Nakamura, *Acc. Chem. Res.*, **50**, 1281 (2017). 7) L. Palatinus, P. Brázda, P. Boullay, O. Perez, M. Klementová, S. Petit, V. Eigner, M. Zaarour, S. Mintova, *Science*, **355**, 166 (2017). 8) ChemRxiv™ における文献2の掲載記事 ([https://chemrxiv.org/articles/The\\_CryoEM\\_Method\\_MicroED\\_as\\_a\\_Powerful\\_Tool\\_for\\_Small\\_Molecule\\_Structure\\_Determination/7215332](https://chemrxiv.org/articles/The_CryoEM_Method_MicroED_as_a_Powerful_Tool_for_Small_Molecule_Structure_Determination/7215332)). 9) *Science Translational Medicine* 誌の紹介記事; D. Lowe, "Small Molecule Structures: A New World," Oct. 18, 2018 (<https://blogs.sciencemag.org/pipeline/archives/2018/10/18/small-molecule-structures-a-new-world>). 10) *Science* 誌の速報; R. F. Service, "A new day for chemistry': Molecular CT scan could dramatically speed drug discovery," Oct. 19, 2018 (<https://www.sciencemag.org/news/2018/10/new-day-chemistry-molecular-ct-scan-could-dramatically-speed-drug-discovery>).