

結晶スポンジ法による非結晶性・極小量化合物の X 線結晶構造解析

東大院工 藤田 誠・猪熊泰英

1. はじめに

分子の構造決定が迅速かつ正確にできるようになれば、研究の急速な発展が見込める分野は数多い。合成化学や天然物化学、代謝解析など、分野によって差はあれ研究時間においてかなりの部分が分子構造の決定に費やされていることは事実である。当然、扱う化合物も様々であるため、予想される構造や化学的性質に基づいて研究者は質量分析や核磁気共鳴(NMR)、赤外・可視・紫外分光などの分析ツールを使い分け、最終的には複数のデータをもとに真の構造に迫らなくてはならない。各測定機器は測定精度や使いやすさの面で飛躍的な発展を遂げてはいるが、これらのデータを総合的に解釈し矛盾の無い構造へと結びつける作業だけは、やはり自動化が困難で時間を要するのが現状である。そのような分析手法の中で、単結晶 X 線構造解析はひととき精度よく分子の立体構造を得ることができる。2次元 NMR など測定時間のかかる分光法を駆使しても大雑把にしか掴めない分子の立体化学が、原子間距離まで百分の一オングストロームの単位で正確に決定できる点は、この手法の大きな利点であると言える。全ての化合物を単結晶 X 線構造解析によって構造決定できれば、結果として研究全体の大幅な時間短縮につながるのだが、この手法には1つの大きな難点があった。それが化合物の結晶化である。NMR の測定サンプルが化合物を重溶媒に溶かすことで調整されるように、単結晶 X 線構造解析ではサンプルの単結晶を作製しなければ測定ができない。しかし、全ての化合物が結晶化するという保証は無く、結晶化に要する時間やサンプル量も予測が困難であることから、敬遠されるケースも少なくはない。

最近、筆者らは結晶化の過程を全く必要としない「結晶スポンジ法」という単結晶 X 線構造解析のための新しい手法を開発した (図 1)。¹⁾ この手法では、結晶スポンジと呼ばれる細孔性結晶を対象化合物の溶液に浸すだけで、測定用の単結晶サンプルが作製できる。そのため、対象化合物の結晶性は全く問題とせず、油状のサンプルであっても単結晶試料が得られる。また、100 μm 角の結晶 1 粒から試料が調整できるため、ナノグラム量のサンプルでも解析が可能になった。本稿では、この最新手法の成り立ちと適用範囲、そして研究への応用を紹介する。



図 1 結晶スポンジ法における構造解析用試料の作成

2. 結晶スポンジ法の原理

結晶スポンジ法の原理を説明する前に、単結晶 X 線構造解析について簡単に触れておく。単結晶 X 線構造解析では、周期的に規則正しく分子が並んだ結晶に X 線を当て、その回折点を解析することで構造情報を得る。つまり、情報源となる回折点を得るためにサンプルが満たすべき条件は、分子が 3 次的に周期配列していることである。これを結晶化によって達成しようとする場合、一般的な有機分子であれば一辺が 0.1 mm 以上の単結晶を成長させることで、ラボマシンのような構造解析ができるようになる。結晶になりにくい化合物は、この段階がうまくいかない。

結晶スポンジ法では、このような結晶性の悪い化合物のために予め周期的に配置された枠(結晶スポンジと呼ぶ)を提供することで周期配列を促す(図 2)。結晶スポンジは、ちょうどジャングルジムのような剛直な骨格と空孔を持った構造をしている。もちろん分子を扱う枠組みであるから、空孔は 1 ナノメートル程度の大きさが必要であるが、実はこのようなサイズの孔が空いた結晶材料は既に様々なものが知られている。一般に MOF (metal-organic framework) や PCP (porous coordination polymer)^{2,3)} と呼ばれる細孔性材料がそれにあたり、近年では基礎研究と応用の両面で爆発的な広がりを見せている。しかし、このような細孔性結晶が全て結晶スポンジとして利用可能というわけではない。⁴⁾

結晶スポンジとして細孔性結晶が満たすべき条件は、細孔内である決まった位置に解析対象分子(ゲスト分子)を引きつけておくためのホスト-ゲスト相互作用を有することである。細孔の中にただ分子を包接しただけでは、細孔内で分子が拡散し、配向が揃った形で並ぶことはない。このような場合、ゲスト分子に由来する回折点がきちんと得られず激しいディスオーダーとなって解析される。構造を明瞭に観測するためには、ゲスト分子がホストとなる骨格の一部と分子間相互作用によって繋ぎ止められている必要がある。

結晶スポンジの細孔内で使われる分子間相互作用は、水素結合、疎水性相互作用、 π - π 相互作用、CH- π 相互作用、CT 相互作用、双極子-双極子相互作用など化学における一般的なものである。しかし、これらは分子が溶液中のように流動性をもって動

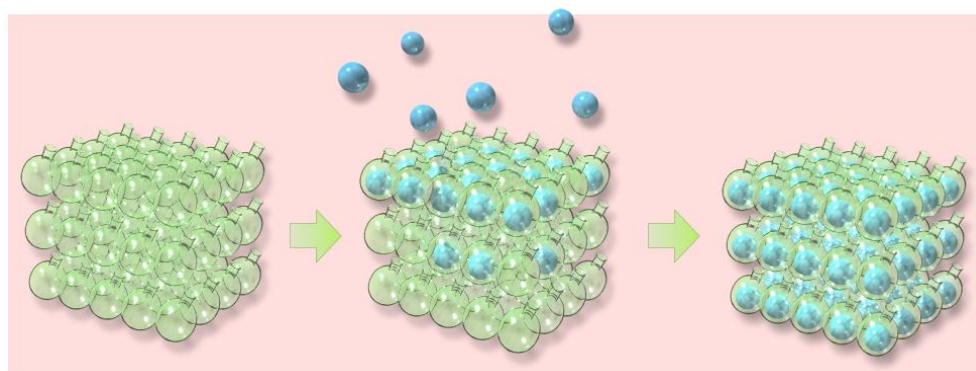


図 2 結晶スポンジ法の原理。「結晶化した空間」に対象化合物を流し込むことで、その周期配列をつくりだす。

き回る細孔の中では、分子の配向を完全に制御できるほどの効果はなく、室温では平衡的に骨格とくっついたり離れたりを繰り返している。ところが、結晶スポンジを用いて単結晶 X線構造解析を行う際には、約 $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ の低温で測定するため、分子の熱運動による拡散がほぼ完全に抑制されることで、上記のような弱い相互作用が効果的に働くようになる。この原理を駆使してゲスト分子の周期配列を促し回折点を得ることこそが結晶スポンジ法なのである。

まず構造が比較的シンプルな結晶スポンジ **1**⁵⁾を例に、この解析の仕組みを詳しく解説する。結晶スポンジ **1**は、正八面体のケージ型ユニットがコバルトイオンを介して3次的に無限に連結された構造をもつ。このケージ型部分構造は、溶液中で様々なゲスト分子を取り込むことで知られる分子ケージ **2**と同型である。分子ケージ **2**の中では、電子不足な配位子であるトリス(4-ピリジル)トリアジン配位子(**3**)に由来する疎水性相互作用や CT 相互作用が働いてゲスト分子が強く包接されるため、同型の結晶スポンジ **1**にも同様な相互作用が働くと考えられる。そこでゲスト分子として、テトラチアフルバレン(TTF)をトルエン溶液として結晶スポンジ **1**の単結晶に1滴垂らしてみると、みるみるうちに結晶の色が CT 相互作用に由来する暗緑色に変化した。この結晶を $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ で単結晶構造解析すると、ネットワーク化されたケージの中に包接された4分子の TTF がディスオーダーすることなく観測できた(図3)。結晶構造における面間距離からドナー性の高い TTF と配位子 **3**の間には CT 相互作用が働いていることが示唆され、これがゲスト分子を配列させる要因となっていることも分かった。

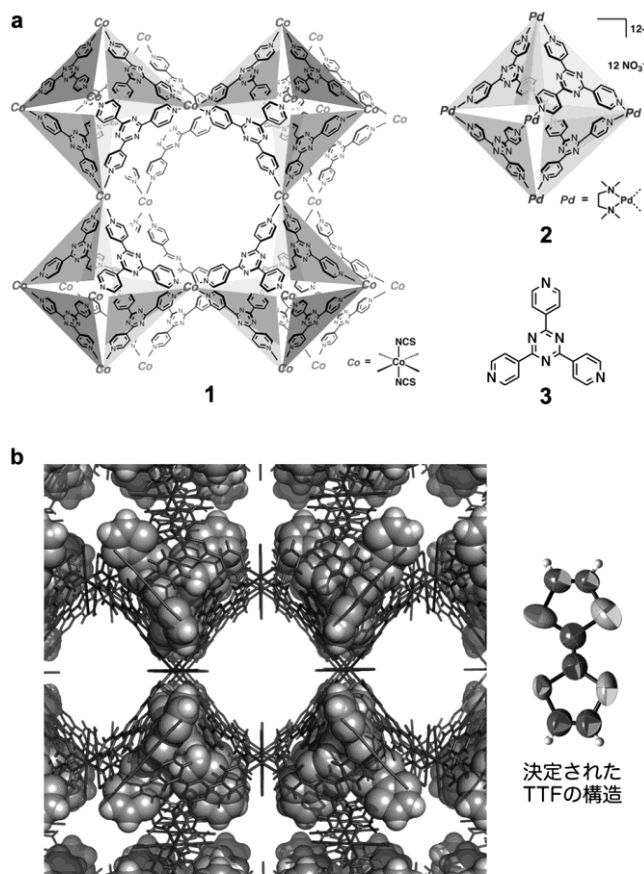


図3 結晶スポンジ法の原型となったネットワーク化ケージ錯体による結晶構造解析

a: 結晶スポンジ **1**, 分子ケージ **2**, および配位子 **3** の構造, b: TTF 分子が包接された結晶スポンジ **1** の結晶構造

化学的な考察まで含めれば多少複雑だが、上記の構造解析において実際に行った操作は、結晶スポンジ1粒を解析対象化合物の溶液に漬けて、汎用の単結晶構造解析装置により回折データを測定しただけである。この原理をもとに、以下ではより解析対象の幅を広げた解析手法を示す。

3. ナノグラム～マイクログラム量での解析

単結晶 X線構造解析は、元来たった1粒の単結晶から分子構造を解析することができる微量分析の手法であった。それにもかかわらず、研究者たちがそのメリットをあまり感じていなかった理由は、「単結晶があれば」という前提条件があったためである。通常、数マイクログラムのサンプルから同じ重量の単結晶が1粒のみが得られることはなく、測定用の1粒を得るために何倍ものサンプル量を用意し、さらに溶媒条件の検討などをする必要があった。一方、結晶スポンジ法では、用いるホスト結晶を1粒に限定することで、限られた量の試料をそこに集約させてサンプルを作製することができる。そのため、従来の再結晶法に比べてサンプルの無駄がない。この性質を用いれば、本来 X線結晶構造解析が持っている微量分析という特徴を最大限に活かすことができる。

極少量スケールの構造解析にあたっては、ゲストの汎用性と解析の容易さを考慮して、ケージ錯体 **1** と共通の配位子 **3** から構成されながらも、より安定性が高く対称性の低い構造を有する結晶スポンジ $[(ZnI_2)_3(\mathbf{3})_2]_n$ (**4**)⁶ を用いて条件最適化を行った。この結晶スポンジ **4** は、断面積が約 $5 \times 8 \text{ \AA}^2$ の細孔を有する。実験室で利用できる回折計に

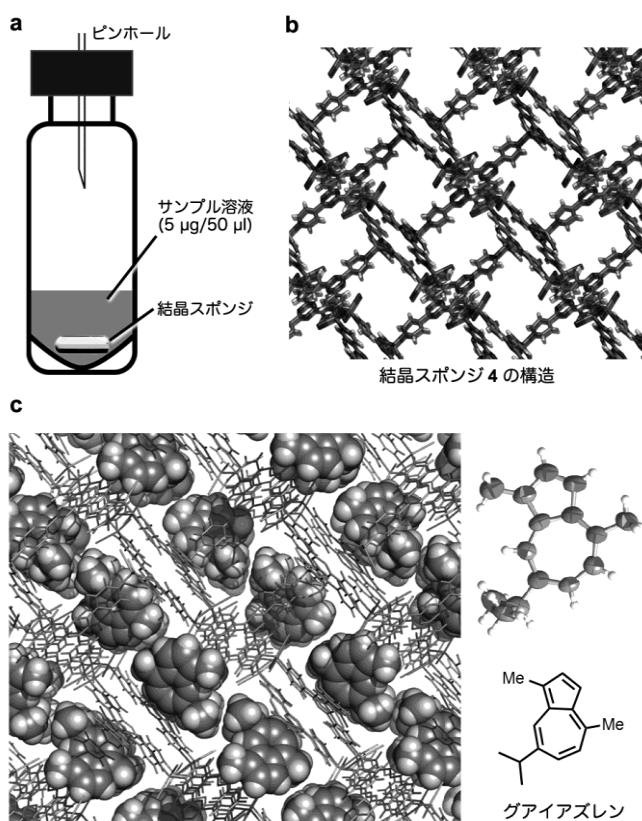


図4 結晶スポンジによる微量化合物の結晶構造解析手法 a: 単結晶試料調整のためのバイアル, b: 結晶スポンジ4の構造, c: 結晶スポンジ法により5 µgのサンプルから得られたグアイアズレンの結晶構造

グアイアズレン

適した 100 μm 角サイズの結晶スポンジ **4** をマイクロバイアルに 1 粒取り分け、そこにゲスト化合物として 5 μg のグアイアズレンを溶解したシクロヘキサン溶液を加えた。バイアルの蓋に空けたピンホールを通して溶媒を揮発させることで、ゲスト溶液をゆっくりと濃縮すると、無色の結晶 **4** が濃青色へと変化した。⁷⁾ この結晶を X 線構造解析すると、細孔内で配位子 **3** との CH- π 相互作用により捉えられたグアイアズレンの構造が得られた。わずか 5 μg のサンプルが溶液中から結晶スポンジ内へと濃縮包接された結果である (図 4)。

さらに得られた結晶構造からは、細孔内がグアイアズレンで埋め尽くされるのではなく、溶媒分子ともうまくパッキングをしながら、ホスト錯体の骨格と相互作用の強い特定の位置にのみゲストがトラップされていることが分かった。実際にトラップされた部分に存在するゲストの量を計算してみたところ、わずか数十ナノグラムであった。そこで、ゲスト量を 50 ng にまで下げて同様な実験を行ったところ、包接量は劣るものの、置換基の位置や環状構造を把握するには十分な構造データが得られた。

その後の研究から、化合物の使用量と包接量(厳密には X 線構造解析におけるゲスト分子の占有率)およびデータ精度には密接な関係があることが分かってきた。精度の良いデータを得るために必要なサンプル量は化合物によって異なるが、100 μg 程度までは使用するサンプル量を増やすほど占有率が増加しデータの精度が向上する傾向にある。本稿では、極少量という点に重点をおき、以下では 5 μg 程度のサンプルを用いた結晶スポンジ法の応用に関して述べる。

4. 解析できる化合物の種類

結晶スポンジ **4** を用いた構造解析では、その細孔を構成するトリアジン配位子 **3** と親和性の高い疎水的な分子を中心に、芳香族化合物や多環性炭化水素など様々な化合物が解析できる。中でも、2,6-ジイソプロピルアニリン、桂皮アルデヒドなどベンゼン誘導体は、解析した中でも解析が容易なものが多かった。200 種類以上の化合物を試した上で経験的に得られた解析可能な化合物サイズの上限は、フラボンやステロイドの誘導体であった。また、柔軟性の高い炭化水素では環状のものが比較的解析しやすく、11 員環のフムレンでも解析に成功している (図 5)。

中でも注目すべきは、キラルな化合物の解析である。結晶スポンジ **4** は、ゲスト包接前において映進面を有するアキラルな骨格を有するが、光学活性なサントニンを包接した場合、骨格にゲスト由来の不斉が誘起され、キラルな $P2_1$ という空間群に変化した。さらに、錯体に含まれる亜鉛やヨウ素といった重原子の異常分散を利用することで、Bijvoet 法により絶対構造が決定できた。たった 5 μg のサンプルから絶対構造の解析までできることは、結晶スポンジ法の大きなメリットと言える。この絶対構造決定の適用範囲については、後述する。

一方で、水溶性の高い化合物や配位性官能基を有する化合物は、結晶スポンジの単

結晶性を保ったままゲストを包接することが難しく、解析できていないものも多々あ

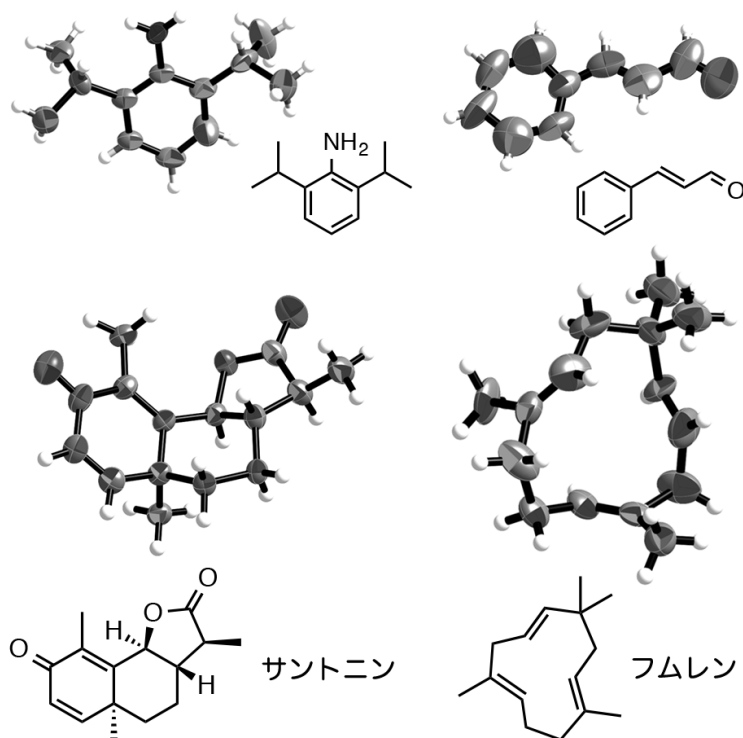


図5 結晶スポンジ4を使って解析に成功した化合物

る。このような化合物に対しては、細孔内の環境を官能基化によって制御したり化学的により安定な錯体を合成したりすることで解析が可能になると考えられる。最も解析例の多い結晶スポンジ4に限って言えば、質量分析などから推定されるおおよその分子構造と官能基をもとに、解析が可能かどうかのスクリーニングができるようになってきている。将来的には、このような適用範囲が既知の結晶スポンジを何種類か提供することで、様々な大きさの化合物に包括的に対応したいと考えている。

5. 結晶スポンジ法の実用

結晶スポンジ法が必要とする約 $5 \mu\text{g}$ というサンプル量は、一般的な高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析する際に分離される試料から供給することもできる。この利点を活かしてHPLCにより分取した微量のフラクションを直接、結晶スポンジに染み込ませて解析するという新手法 LC-SCD (liquid chromatography–single crystal diffraction)法を開発した。

温州ミカンの果皮から抽出した脂溶性フラボノイドをHPLCにより分離・分析することで、3つの主成分を数マイクログラムずつマイクロバイアルの中に分取した。それぞれの化合物を同じマイクロバイアルの中で結晶スポンジ4に包接させることで単結晶試料を作製し、X線結晶構造解析を行ったところ複数のメトキシ基が置換した異なる3種類のフラボノイドの構造を得ることができた(図4)。このLC-SCD法におい

では、結晶スポンジを含んだコレクション用バイアルとオートコレクターを使い、簡単な操作で狙ったフラクションのみを選択的に分離し単結晶試料を作製することもできる。そのため、天然物化学や代謝物解析など複数の化合物を同時に扱わなくてはならない分析において非常に有効な手段になると考えられる。

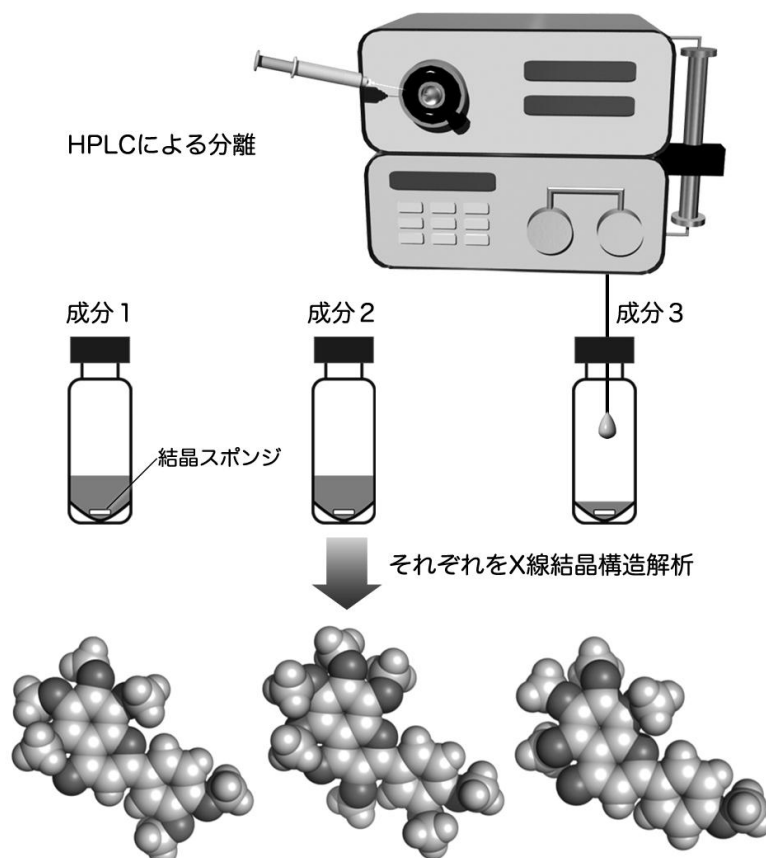


図6 LC-SCD法の概略図

合成化学の研究においても結晶スポンジ法の用途は幅広い。例えば、何十ステップもの反応を経なければならない天然物合成において、要となる中間生成物に対し結晶スポンジ法を TLC のような感覚で立体化学のチェック手段として用いることができる。複雑な NMR の解析をする代わりに結晶スポンジ法により結晶構造を確認することで、構造に確信を持って次の合成段階に進むことが可能になるし、時間の短縮にも繋がる。また、反応開発においてもクロマトグラフィーの標品となる新規化合物を結晶スポンジ法によって簡便に決定することで、反応条件最適化の一助となることが期待される。

このような応用は、結晶スポンジ法が報告されてすぐに世界中の研究室で始まりつつある。井上らの研究グループでは、3成分のラジカルカップリングにより得られる生成物の立体配置を確認するために結晶スポンジ法による解析を行い、それが NOE 測定の結果とも合致することを確認している。⁸⁾ また、Buchwaldらは、チオトリフル

オロメチル化剤として用いられる超原子価ヨウ素化合物の構造を結晶スポンジ法により決定することに成功した(図7).⁹⁾ 利用法は分野によって様々であるが、シンプルな構造決定手法がここまで急速に研究分野に浸透していったことは結晶スポンジ法を開発した筆者らにとっても驚きである。

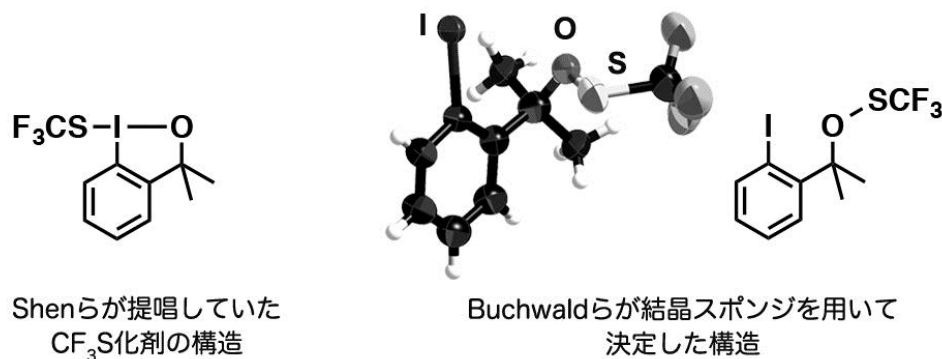


図7 結晶スポンジ法の合成化学への応用例

6. 課題と注意点

ここまで結晶スポンジ法の長所を示してきたが、この新手法には未だクリアしなければならない課題が多く残されている。その1つが解析精度の評価である。試料の調整を結晶スポンジと解析対象化合物とのホスト-ゲスト相互作用を用いて行うため、化合物の種類によってはゲストを固定化するための相互作用が弱く、包接が十分に行えなかったり溶媒分子とディスオーダーしたりする場合がある。それでも結晶スポンジ自体は、少なくともホスト骨格に対応する回折データは与えるため、化合物の種類と調整条件によって様々な質のデータを与える。包接量が多く相互作用も強い場合は、一般的な結晶構造解析の要領で簡単にゲスト分子の構造が得られるが、そうでない場合もしばしば見受けられる。実際、我々が結晶スポンジ **4** を用いて海洋天然物であるミヤコシン A の絶対構造解析に挑んだ時には、包接量が少なく(占有率が約 50%)柔軟なアルキル鎖の影響でディスオーダーが激しかったため、誤った立体化学を導いてしまった。¹⁰⁾ ミヤコシン A の正確な絶対構造は、後に松永、森らによって決定されたが^{11,12)}、一般的な単結晶 X 線構造解析と同様に、この手法のみに依存した構造決定はデータ精度によっては危険な面を孕んでいるという重要な教訓を得る結果となった。

結晶スポンジ法が未知の構造情報を得るための信頼のおける手法となるには、やはりデータ解析において指針がなくてはならない。具体的な指針に関しては現在、複数の結晶学者と議論を重ねているところであるが、例えば、NMR や質量分析で大雑把に構造が推定されている化合物のサポートとして用いる場合と、HPLC から単離されたばかりの全く未知なものを構造決定する場合は、要求されるデータの質の閾値に差があっても良いのではないかとと思われる。

また、望むようなデータが得られない場合の対応策として、新規結晶スポンジを開発する事も重要である。特に、細孔の大きさと親水・疎水性など細孔内環境のバリエーションを豊かにすることで、適応の幅は大きく広がると考えられる。未知の化合物に対しては、何種類かの結晶スポンジを試してベストなもので構造決定をするといった形がこの手法が一般化された場合の理想型かもしれない。

7. おわりに

結晶スポンジによる微量化合物の構造解析法を開発したことで、研究段階では全く予期していなかった異分野の構造決定における問題点や悩みが分かってきた。次は結晶スポンジ法がそれらを解決してゆくことで、今は全く想像もつかない様な発見や応用展開が見えてくるのではないだろうか。ただし、この産まれたての解析手法にはまだまだ多くの研究要素が残されており、その1つ1つをクリアしていくことで、ユーザーとなる研究者達の信頼を獲得していかなければならない。近い将来、結晶スポンジ法が NMR や質量分析と肩を並べる程の汎用性を持って研究の場に受け入れられることを願いながら、今後も研究を進めていきたい。

(本稿執筆：猪熊泰英)

引用文献

- 1) Inokuma Y. et al., *Nature*, **495**, 461-466(2013).
- 2) Yaghi, O. M. et al., *Nature*, **423**, 705-714(2003).
- 3) Kitagawa, S. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 2334-2375(2004).
- 4) Inokuma Y. et al., *Nat. Chem.*, **3**, 349-358(2011).
- 5) Inokuma Y. et al., *Nat. Chem.*, **2**, 780-783(2010).
- 6) Biradha, K., Fujita, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 3392-3395(2002).
- 7) Inokuma Y. et al., *Nat. Protoc.*, **9**, 246-252(2014).
- 8) Kamiura, D. et al., *Org. Lett.*, **15**, 5122-5125(2013).
- 9) Vinogradova, E.V. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press. (DOI: 10.1002/anie.201310897)
- 10) Inokuma Y. et al., *Nature*, **501**, 262(2013).
- 11) Hitora, Y. et al., *Tetrahedron*, **69**, 11070-11073(2013).
- 12) Mori, K. et al., *Tetrahedron*, **70**, 392-401(2014).