

新規生理活性物質の開発を目的としたデヒドロアビエチン酸類似体
およびチオアミドオリゴマーの放射光利用微小単結晶 X 線回折法に
よる絶対構造決定

**Absolute structure determination of dehydroabietic acid analogs and
thioamide oligomers for development of biologically active agents using
small single crystals by synchrotron X-ray diffraction method**

梶 飛雄真^a, 川幡 正俊^a, 東屋 功^a, 山口 健太郎^a, 三浦 圭子^b

Hyuma Masu^a, Masatoshi Kawahata^a, Isao Azumaya^a, Kentaro Yamaguchi^a, Keiko Miura^b

^a徳島文理大学香川薬学部, ^b高輝度光科学研究センター

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences at Kagawa Campus, Tokushima Bunri University,

^bJapan Synchrotron Radiation Research Institute

重原子の異常分散を利用して、生理活性が期待される有機低分子化合物の絶対構造決定に成功した。自由な波長変更が可能な放射光を用いることにより、微小結晶の迅速かつ確実な絶対構造決定が可能であることを実証した。

Absolute structures of organic small molecules expected bioactivity were determined by use of anomalous dispersion of heavy atoms. Rapid and certain determination of absolute structure for micro crystal was established by synchrotron X-ray diffraction with flexible changing of wavelength.

背景と研究目的

現代の医薬品開発において、生体内反応を分子レベルで解明し、それに適合する分子をデザインすることは極めて重要である。生体内反応の主役である蛋白質は、キラルな構造とそれに基づく高い立体選択性を有しているため、生理活性物質のデザインにおいても、分子の立体構造およびキラリティーの制御が不可欠である。

X線回折によって分子の絶対構造を決定する手法としては、重原子の異常分散を利用してバイフット対の強度を比較する方法が知られている。しかし、バイフット対の強度差が明確に生じる波長は原子種によって異なるた

め、確実な絶対構造決定のためには、原子種に応じて照射波長を変えた測定を行う必要がある。加えて、サイズが数十 μm 以下の微小結晶しか得られない化合物については、実験室装置での迅速な構造解析は困難である。

そこで我々は、 0.7\AA から 1.5\AA 程度までの波長選択性の幅のある構造生物学ビームラインにて、生理活性が期待される有機低分子の絶対構造を迅速かつ確実に決定することを試みた。

対象化合物

対象化合物を Fig.1 に示す。芳香族スルホンアミド **1** は、軸性不斉を有する構造既知の化合物であり、実験の標準物質として用いた。

チオアミドオリゴマー**2**は、アザビシクロ骨格とチオアミド結合によってねじれた折りたたみ構造を持つと考えられ、新規生理活性物質のコンポーネントへの応用が期待できる。¹ またデヒドロアビエチン酸類似体**3**は、平滑筋の弛緩、神経伝達物質の放出抑制などに関わるBKチャネル開口物質の前駆体である。

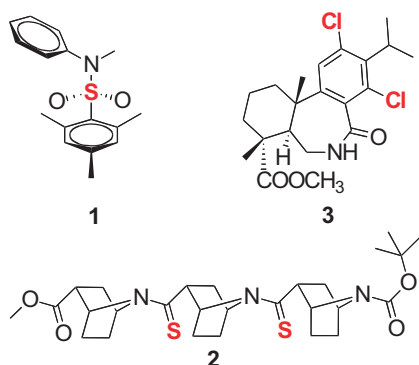


Fig. 1. Three compounds containing heavy atoms.

実験

測定条件を Table 1 に示す。それぞれの結晶について、まず波長 0.7Å で回折データ収集を行い（1件につき 15–60分）、次に試料が含有する重原子（S または Cl）の異常分散項が十分大きい波長として、1.3Å で連続して測定した（1件につき 20–90分）。積分強度算出にはソフトウェア *HKL2000* を用いて、スケーリングの際にバイフット対の反射を分けた設定で行い(scaleano)、初期構造決定は *Shelxs-97*、構造精密化は *Shelxl-97* で行った。なおいずれの試料においても、初期構造決定には波長 0.7 Å で測定したデータを用いた。

Table 1. Conditions of Structural Analysis for 1–3.

Compound	1		2		3	
Crystal Size (μm)	100 × 50 × 20		200 × 30 × 10		300 × 30 × 10	
Temperature (K)	100		298		100	
Distance (mm)	75		75		75	
Wavelength (Å)	0.7	1.3	0.7	1.3	0.7	1.3
Exposure Time (s)	2	1	20	40	15	10
ω-Step (°)	1	3	1	1	2	2
ω-Range (°)	0–180	0–180	0–180	0–180	0–180	0–180
No. of Frames	180	60	180	180	90	90

結果および考察

1) 化合物 1 の絶対構造決定

はじめに、既知の芳香族スルホンアミド **1** (C₁₆H₁₉NO₂S, MW289.39) の絶対構造決定を行った。結果を Table 2 に示す。Flack parameter はいずれの波長でも 0 に近い値で精密化されたが、波長 0.7 Å での測定データを用いた場合、正の構造を示すバイフット対の数と偽の構造を示すバイフット対の数の比は、2.1 となった一方、波長 1.3 Å での測定データを用いた場合、全反射数は 0.7 Å の場合に比べて減少するが、正と偽のバイフット対の数の比は 3.7 となり、より明確に正の構造が支持された。このことから、分子量 300 程度で S 原子を含む化合物の絶対構造決定に、波長 1.3 Å での測定が有効であることを確認した。

Table 2. Structural Analysis for 1.

Compound	1	
Formula, F.W.	C ₁₆ H ₁₉ NO ₂ S, 289.39	
Crystal System,	Orthorhombic	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
a, b, c (Å)	9.961(5), 10.651(5), 13.963(5)	
V (Å ³)	1481(1)	
Z	4	
Wavelength (Å)	0.70	1.30
Resolution (Å)	0.67	1.26
R ₁ (all data)	0.0324	0.432
R _w (all data)	0.0922	0.1150
GOF	1.048	1.139
Reflection No.	13760	2004
Correct ¹⁾	1839	541
Incorrect ²⁾	893	146
Correct/Incorrect	2.1	3.7
Flack Parameter	0.00(5)	0.000(6)

1) Number of Bijvoet pairs: $\Delta F_o/\Delta F_c > 0$.

2) Number of Bijvoet pairs: $\Delta F_o/\Delta F_c < 0$.

2) 化合物 2 の絶対構造決定

チオアミドオリゴマー**2** (C₂₇H₃₉N₃O₄S₂, MW533.75) の構造解析結果を Table 3 に示す。予想に反してチオアミド骨格はほぼ平面性を保っており、ねじれた折りたたみ構造は見られなかった (Fig. 2)。今後、この結果を活か

して分子の再設計を試みる必要性が考えられる。正の構造と偽の構造の比は波長 0.7 Å の場合に 1.6、波長 1.3 Å では 4.3 となり、波長 1.3 Å で明確に正の構造を支持する結果が得られた。

Table 3. Structural Analysis for **2** and **3**.

Compound	2		3	
Formula, F.W.	C ₂₇ H ₃₉ N ₃ O ₄ S ₂ , 533.75		C ₂₁ H ₂₇ Cl ₂ NO ₃ , 412.35	
Crystal System	Orthorhombic		Orthorhombic	
Space Group	P2 ₁ 2 ₁		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
a, b, c (Å)	7.203(1), 13.912(3), 28.665(6)		10.125(5), 31.119(5), 32.472(5)	
V (Å ³)	2873(1)		10231(6)	
Z	4		16	
Wavelength (Å)	0.70	1.30	0.70	1.30
Resolution (Å)	0.67	1.25	0.67	1.25
R ₁ (all data)	0.0443	0.0462	0.1649	0.1154
R _w (all data)	0.1059	0.1200	0.3490	0.2880
GOF	1.086	1.108	1.067	1.342
Reflection No.	7764	924	27671	4404
Correct	1820	282	4203	1191
Incorrect	1144	65	3652	622
Correct/Incorrect	1.6	4.3	1.1	1.9
Flack Parameter	0.00(5)	0.13(4)	0.13(8)	0.13(4)



Fig. 2. Crystal Structure of Thioamide oligomer **2**.

3) 化合物 **3** の絶対構造決定

化合物 **3** (C₂₁H₂₇Cl₂NO₃, 412.35) の構造解析結果は Table 3 に示した。結晶格子の非対称単位には 4 分子の配座異性体と結晶溶媒の Hexane が含まれることがわかった。また 2 分子が互いにラクタム部でダイマー型の N-H...O 水素結合を形成していることが明らかになった (Fig. 3)。これらの異性体の構造から BK チャネルとの相互作用をシミュレーションすることが可能となる。波長 0.7 Å の測定データから得られる Flack parameter は 0.13(8) となっているが、パイフット対の比較からは、正の構造と偽の構造の比は 1.1 となり、有意な差がほとんど見られていない。一方、波長 1.3 Å の測定データからは正の構造

と偽の構造の比が 1.9 となり、明確に正の構造を支持する結果が得られた。

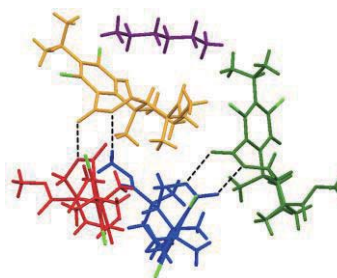


Fig. 3. Crystal Structure of dichlorodehydroabietic acid **3**. Dashed lines represent N-H...O hydrogen bonds.

まとめと今後の展開

Clegg らの guideline²にあるように、Mo 線源の波長 (0.7107 Å) では異常分散項が少ない軽原子のみの結晶データ中の Flack parameter は報告すべきでなく、今回のように、原子種 S 以上の重原子の異常分散項を考慮した波長設定の回折データ測定によって、低分子有機化合物の迅速な絶対構造が報告可能であることを実証した。今後、同様の方法を用いることで、微小結晶あるいは不安定な結晶での絶対構造決定に適用していくことが可能とされる。また重原子を含まない化合物に対しても、誘導体への変換や塩としての結晶化によって重原子を導入することで、幅広い生理活性物質の構造決定に応用していきたい。

参考文献

1. T. Hori, Y. Otani, M. Kawahata, K. Yamaguchi, T. Ohwada, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9102–9108.
2. W.Clegg, *Acta Cryst.*, **2003**, *E59*, e2–e5.

キーワード

生理活性物質、有機低分子、キラリティー；
Bioactive substances, Organic Small Molecules, Chirality