

●——結晶スポンジ法によるホップ代謝物の構造解析

ビール醸造に欠かせないホップ (*Humulus lupulus* L.) は、その代謝物がビールに特徴的な苦みや香りを与える。α酸は、ホップの中でも最も重要な代謝物の一種であり、化学的・物理化学的に同等の性質を持った類縁体から構成されている。これらα酸のうち、フムロンは最も量が多く、ビール醸造過程でシスイソα酸とトランスイソα酸に異性化することが知られている。これらのα酸は、苦みのほか、泡の安定性や抗菌作用に寄与している。

しかし、これらのα酸の立体構造の絶対配置は、2013年まで解明されてこなかった。その原因として、水素原子の不足により核磁気共鳴分光法による分析が困難であることやイソα酸がビール熟成中に複数の誘導体に変化することが挙げられる。ビールの風味や品質は、一般的に試行錯誤を通して改良されており、ホップなどのビール成分の化学的・生物学的理解が品質向上に繋がるとの期待があるが、熟成中に形成されたイソα酸の誘導体の多くは、その後も解明されずにいた。

そこでTaniguchiらは、結晶スポンジ (CS) 法を用いてトランスイソα酸の誘導体の構造解析を行った¹⁾。CS法とは、近年Inokumaらにより発明された有機低分子化合物の単結晶X線構造解析法である²⁾。通常、単結晶X線構造解析では、対象化合物の結晶化が必要である。これに対して、CS法では結晶スポンジと呼ばれる結晶の内部に対象の化合物を取り込んだものを分析するため、結晶化を必要とせず、結晶化が困難な化合物や数μg以下の微量なサンプルの解析が可能となる。この手法により、ビール熟成過程に似た条件 (4 weeks at 40 °C and pH 4.0 in a 5 % EtOH solution) で形成し、高速液体クロマトグラフ法により分離した13種類のトランスイソα酸誘導体の構造を絶対配置まで決定することに成功した。このうち、八つの誘導体は初めて構造が解明された。本研究により解明された誘導体の構造と苦みや抗菌作用などの活性との間の相関を明らかにすることで、ビールの苦み成分制御や品質向上などに貢献できると考えられる。

ビール産業のみならず、従来構造解析が困難な化合物に対する構造決定の需要は多く、CS法は様々な分野での応用が期待される。

- 1) Y. Taniguchi, T. Kikuchi, S. Sato, M. Fujita : *Chem. Eur. J.*, **28**, e202103339 (2022).
- 2) Y. Inokuma, S. Yoshioka, J. Ariyoshi, T. Arai, Y. Hitora, K. Takada, S. Matsunaga, K. Rissanen, M. Fujita : *Nature*, **495**, 461 (2013).

[理化学研究所放射光科学研究センター 渡邊 慎平]

●——振動円二色性分光法を利用した柔軟な構造を持つ脂肪酸の絶対立体配置決定

キラル分子はアミノ酸や糖など、生体内に含まれる多くの化合物を構成しており、我々の生活と密接にかかわっている。これらのキラル分子はそのエナンチオマー間で異なる生物活性を持つ場合も多く、その絶対立体配置決定法の開発は重要である。

キラリティを持つ脂肪酸は生体内で様々な役割を担っている化合物である一方、柔軟な構造を持つことから絶対立体配置の決定が困難な化合物群である。最も強力な絶対立体配置の決定法としてX線結晶構造解析が挙げられるが、脂肪酸のような柔軟な分子は解析に適した結晶を形成しにくく、従来の手法が適用困難である場合が多い。水酸基を有する脂肪酸であればMosher法¹⁾などを用いてNMRにより決定することができるが、誘導化が必要になることから、化学変換を必要としない簡便な絶対立体配置の決定法が強く望まれている。最近、振動円二色性 (VCD) 分光法を利用したキラルな脂肪酸の絶対立体配置の決定が谷口らによって達成されたのでその研究について紹介する²⁾。

谷口らはまずリシノール酸のVCDを用いた絶対立体配置の決定を行った。リシノール酸は1500~1000 cm⁻¹の領域に幾つかの特徴的なVCDシグナルを示した。またリシノール酸の構造を簡略したモデル基質を合成し、そのコンフォメーションを計算したところ、再安定構造から1.6 kcal/mol以内に19個のコンフォマーが得られた。これらのVCDスペクトルを計算し、そのボルツマン分布に基づいて加重平均することで計算によるVCDスペクトルが得られた。これはリシノール酸の実際の測定により得られたVCDスペクトルと非常によい一致を示した。キラル中心でのO-HおよびC-H変形に起因する1404 cm⁻¹の負のバンドを含め、モデル基質の計算結果と1対1の対応を示した。本手法はヒドロペルオキシド化合物にも拡張可能であり、化合物の誘導化を行うことなく絶対立体配置及びそのコンフォメーションの決定に成功している。

本手法を用いることで、これまで絶対立体配置の決定が困難とされてきたキラルな脂肪酸類の絶対立体配置とコンフォメーションが簡便に決定できるようになった。これらの化合物は生体内で重要な役割を担っており、本手法によって得られる絶対立体配置とコンフォメーション

ンに関する知見は脂質生化学の研究や脂質関連医薬品の開発に貢献すると期待される。

- 1) J. A. Dale, H. S. Mosher: *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 512 (1973).
- 2) T. Taniguchi, N. Ida, T. Kitahara, D. O. Agbo, K. Monde: *Chem. Commun.*, **58**, 6116 (2022).

[東北大学大学院理学研究科 梅宮 茂伸]

● クライオ電子顕微鏡による生体材料の立体構造解析

2017年のノーベル化学賞は、「クライオ電子顕微鏡単粒子像解析法」であり、クライオ電子顕微鏡による生体分子の立体構造解析のパイオニアとなった3名の研究者、J. Dubochet, R. Henderson, J. Frankに贈られた。J. Dubochetらは生体試料を急速凍結することで非晶質の氷の中に埋め込む“氷包埋法”を開発した¹⁾²⁾。R. Hendersonらは電子顕微鏡でタンパク質の原子座標を決定できることを示した³⁾。そして、J. Frankらは多数の投影像から立体構造を再構成する“単粒子解析法”を開発した⁴⁾。これらの技術によって、クライオ電子顕微鏡法は、X線結晶解析法やNMR分光法が独占的であった構造生物学の世界に革命をもたらした。

従来の構造解析手法と比較して、クライオ電子顕微鏡法には二つの特徴がある^{5)~7)}。一つ目は生体試料の結晶化を必要としない点である。特に、結晶化がボトルネックでX線結晶構造解明が困難であった膜タンパク質において、クライオ電子顕微鏡法を活用することで、数多くの構造解析成果が報告されている。二つ目はサンプルの形態に制限が少ない点である。数十kDaから数MDaのタンパク質複合体まで、様々なサイズの試料に対応できるため、小さなタンパク質から複合体、ウイルス粒子や細菌、細胞などといった多彩な生体関連試料を観察可能である。

クライオ電子顕微鏡単粒子像解析法は、①試料グリッドの作製、②クライオ電子顕微鏡による画像データの収集、③単粒子像解析、の三つのプロセスに分類できる(詳細は解説記事を参照^{5)~7)})。膜穴グリッドに対してサンプル試料を滴下し、余分な水分を除去した後、液体エタンで凍結(プランジ凍結)する。本グリッドをクライオ電子顕微鏡内に挿入し、適切な条件で電子線を照射することで、数千から数万枚の画像データを取得する。本データをもとに、二次元クラス分類や粒子像の再構築、3次元クラス分類を行い、最終的なモデリングが行われる。

クライオ電子顕微鏡法は、創薬等に資する支援技術基盤(共用ファシリティ)の一つとして整備され、積極的な外部共用や技術的な支援体制が構築されている。具体的には、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム

(BINDS)制度⁸⁾によって、様々な研究者が使用できる環境となっている。今後、医学や創薬に限らず、生命科学・分子生物学・計算科学・材料科学などの学問領域においても、本技術は幅広く利用されるだろう。分解能の向上だけでなく、条件の異なる様々な立体構造情報があらゆる学問領域にブレイクスルーを生み出すことが期待される。

- 1) M. Adrian, J. Dubochet, J. Lepault, A.W. McDowell: *Nature*, **308**, 32 (1984).
- 2) J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell, P. Schultz: *Q. Rev. Biophys.*, **21**, 129 (1988).
- 3) R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. H. Downing: *J. Mol. Biol.*, **213**, 899 (1990).
- 4) J. Frank: *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State*, Oxford University Press, (2006). DOI: 10.1093/acprof:oso/9780195182187.001.0001.
- 5) 難波啓一, 加藤貴之: *日本電子 news*, **50** (1), (2018).
- 6) 藤吉好則: *生物工学*, **97**, 345 (2019).
- 7) 宋 致弘, 村田和義: *日本結晶学会誌*, **63**, 80 (2021).
- 8) <https://www.binds.jp/>.

[京都大学大学院農学研究科 宋和 慶盛]