



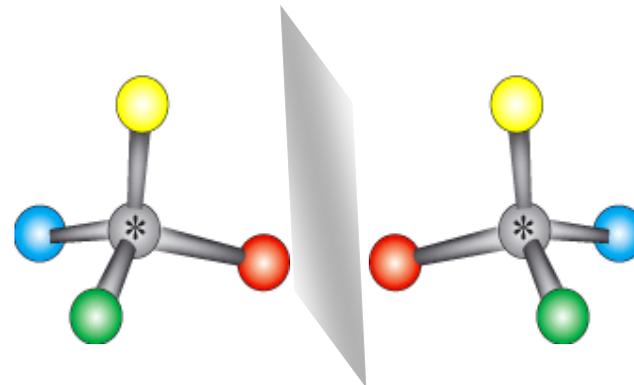
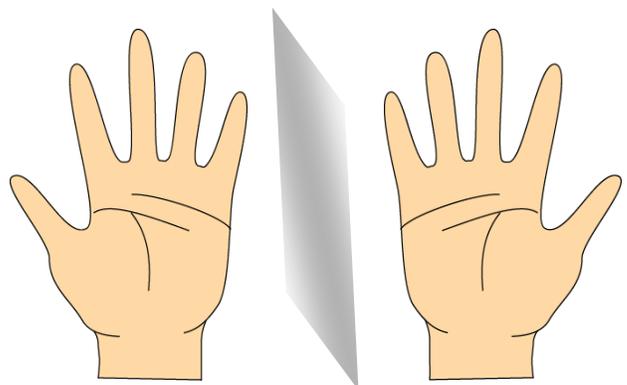
マイクロED／3D EDを活用した 最新の構造解析アプリケーションのご紹介

2024年9月4日

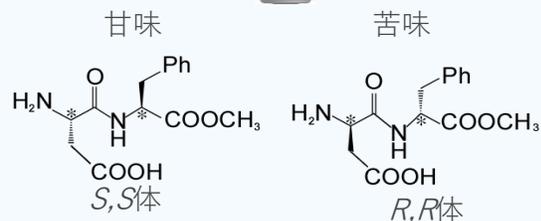
株式会社リガク アプリケーションラボ

菊池 貴

分子の絶対配置と生体作用

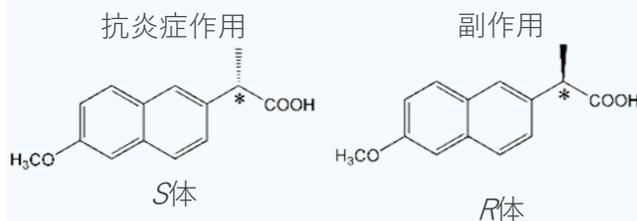


食品



アスパルテーム

医薬品



ナプロキセン

香料

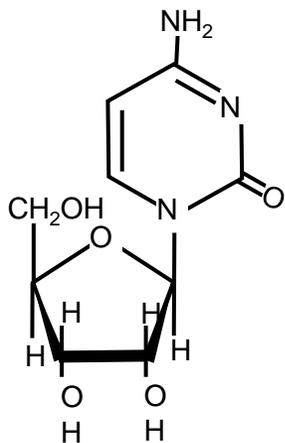


スペアミントの香り ヒメウイキョウの香り

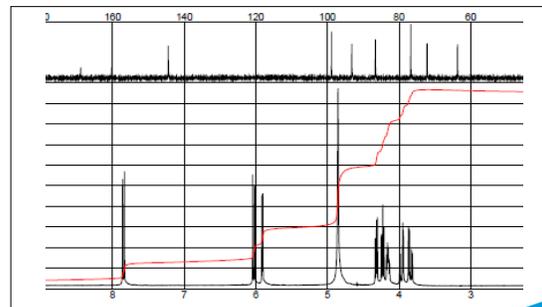


カルボン

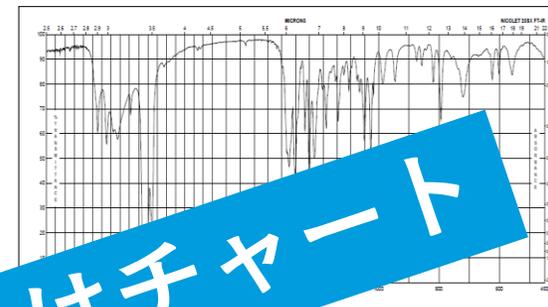
分子構造を決める方法



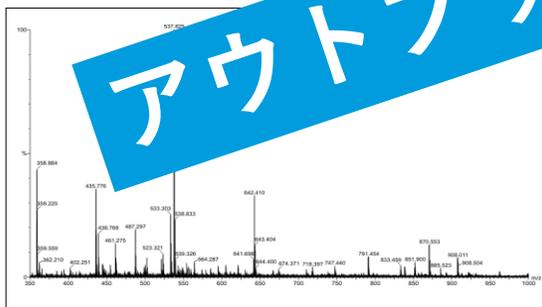
シチジン



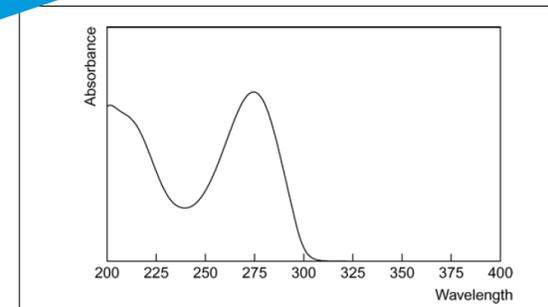
核磁気共鳴分光法 (NMR)



赤外分光法 (IR)



質量分析法 (MS)



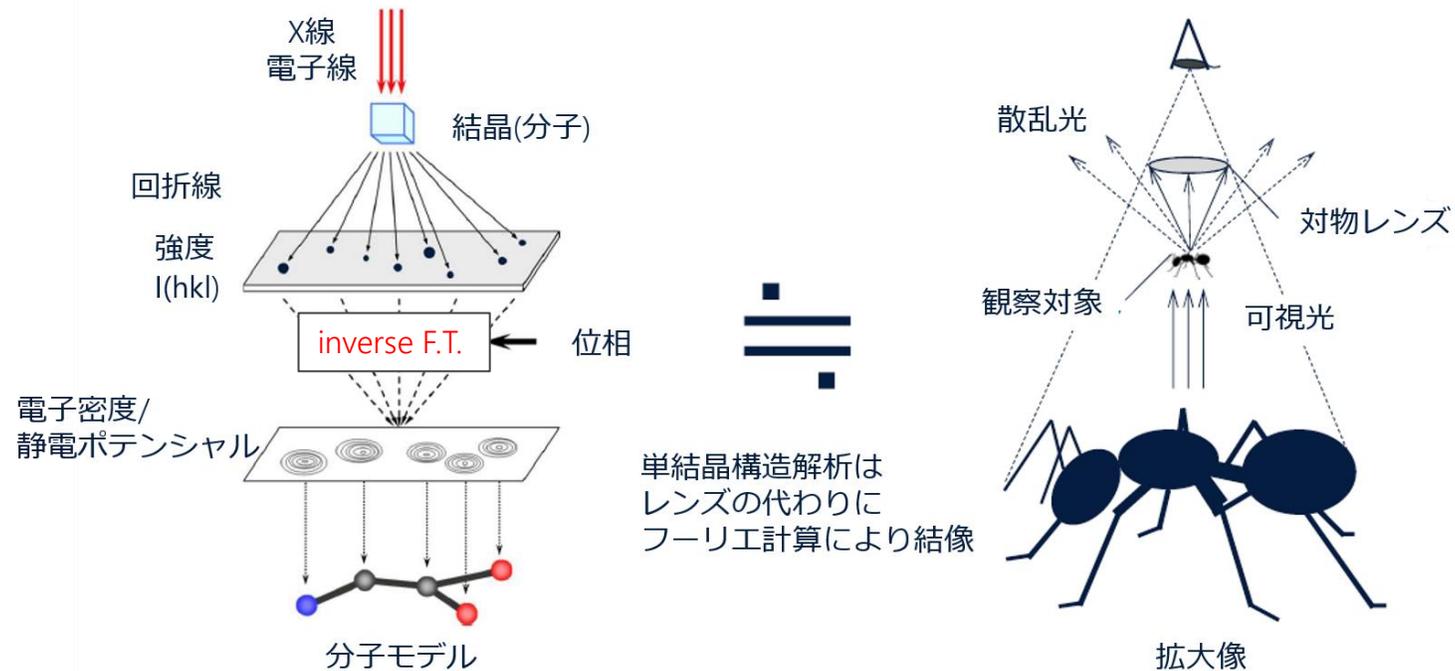
紫外線吸収スペクトル (UV)

アウトプットはチャート

複雑な分子における全原子の立体的配置を一義的に決めることは極めて困難

単結晶構造解析：三次元分子構造の可視化ツール

- 構造未知の新規化合物の三次元分子構造を決定する分析手法
- データベース、化学組成不要。必要なのは一粒の単結晶のみ
- 未知分子の絶対配置を決定する唯一の信頼できる手法





電子回折計 Synergy-EDによる ナノ結晶構造解析

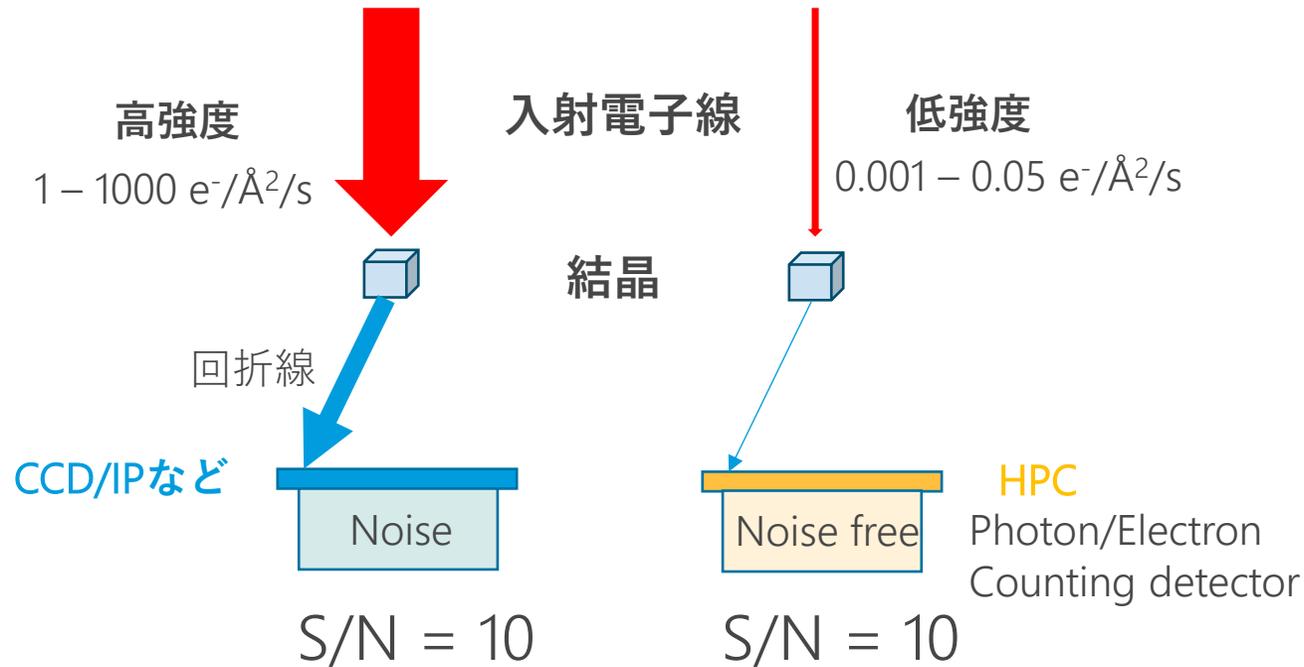
日本電子-リガク共同開発による
3D ED/MicroEDシステム

内容

- 電子回折構造解析(3D ED/MicroED)について
- Synergy-EDの特長
- 構造解析例
- 絶対配置の決定

古くて新しい手法：電子回折(3D ED/MicroED)

- 2010年代に低分子化合物およびタンパク質の構造解析に用いられ再び注目を集める
 → **検出器の発達により、非常に弱い入射電子線でも測定が可能に**

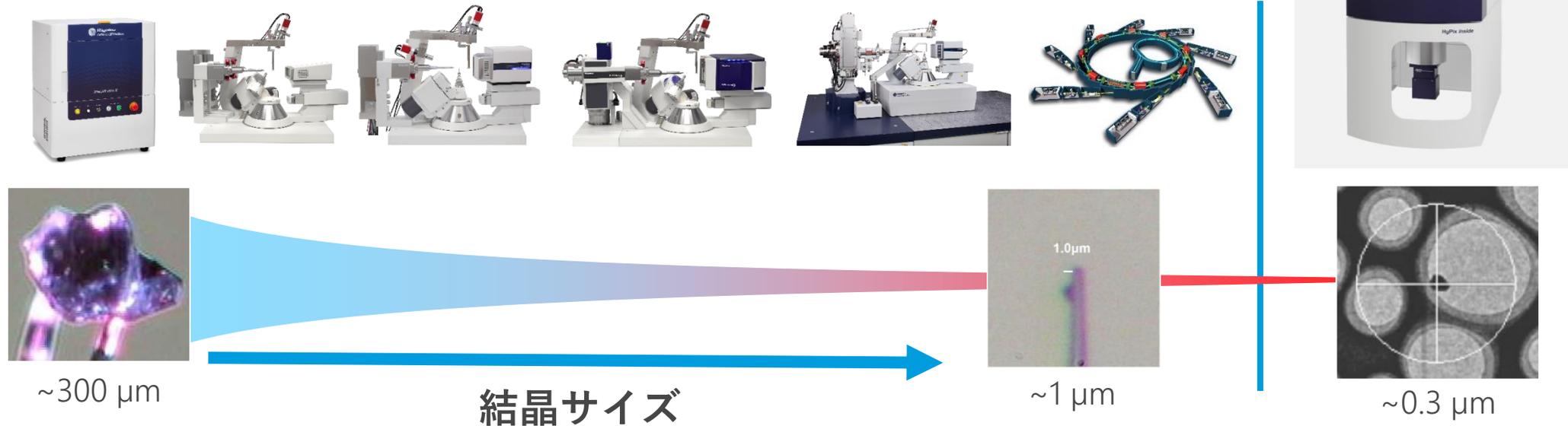


同一のS/Nを得るために必要な
Dose量: 1/1000~1/1000000倍

HPC: 試料損傷を大幅に低減

電子回折 vs. X線回折 による単結晶構造解析

- X線構造解析が可能な結晶サイズの下限は 1 μm
- 電子回折では、**物質との相互作用がX線と比べ数千~数万倍強い**ため、数千分の1の大きさの結晶でも測定可能となる
- 結晶化の簡易化・迅速化が期待される

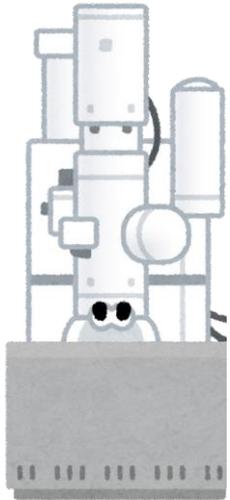


Synergy-EDの特長

TEMによる3D ED/MicroEDの測定および解析

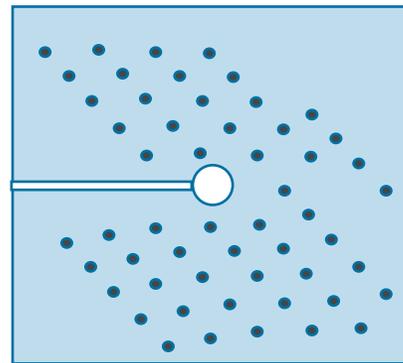
ハードウェアの問題 / ソフトウェアの問題

結晶探索



細かい装置条件設定
TEMからの装置制御
回折/顕微鏡の切り替え

回折強度測定



回折画像データの形式変換
データ処理用入力ファイルの
作成

データ処理

XDS
DIALS
MOSFLM

反射データの形式変換
解析用入力ファイルの作成

構造解析

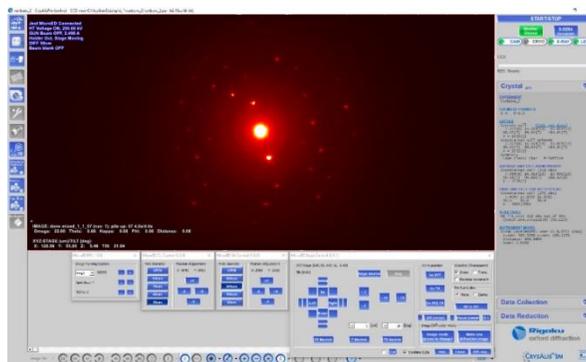
Olex2 (SHELX)
ccp4 (refmac5)
Phaser
Phenix.refine

実験者の負担が大きい

日本電子・リガク共同開発 (2020/5~)



電子回折装置：回折イメージの取得用に最適化し電子回折に特化したTEM



CrysAlis^{Pro} for ED：ハードウェアの性能を限界まで有効活用



検出器：1光子計数型半導体検出器HyPixを電子回折用に最適化

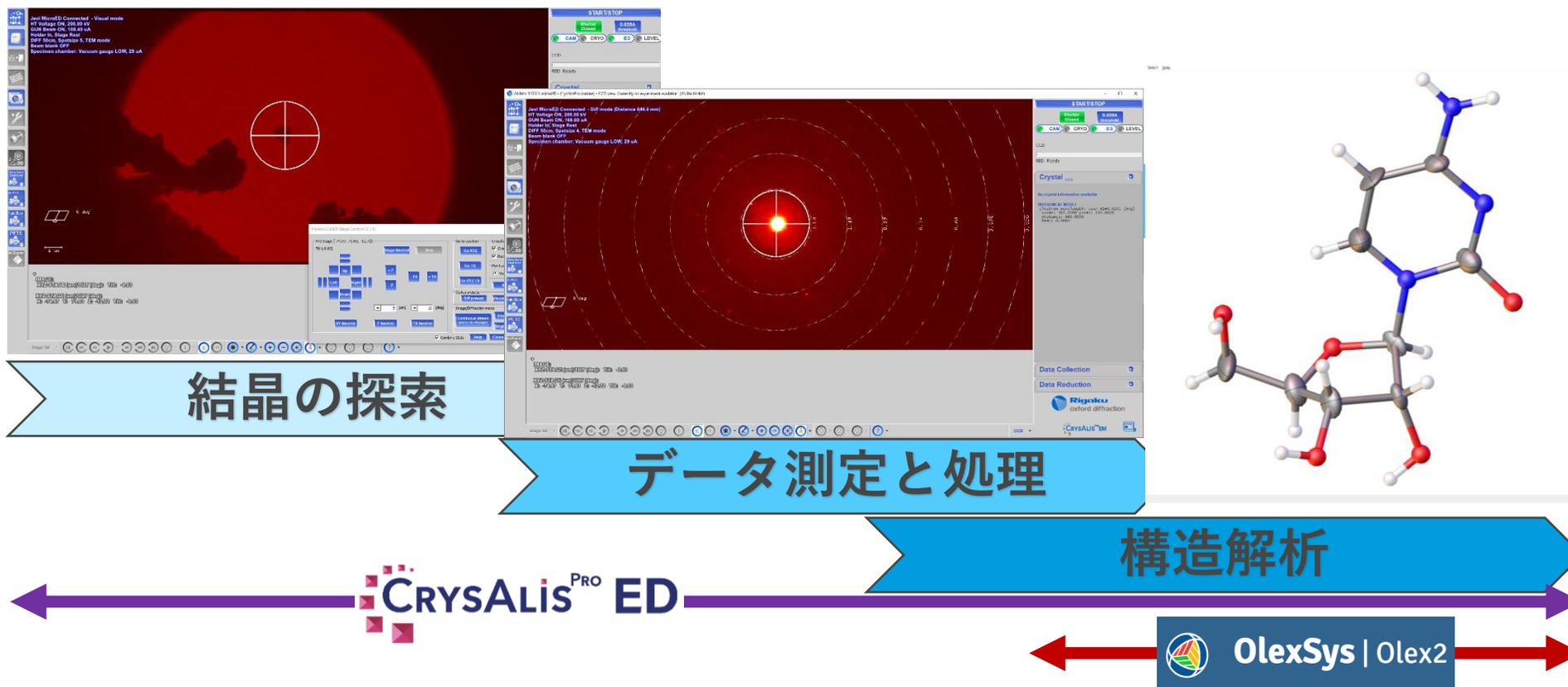


XtaLAB Synergy-ED:

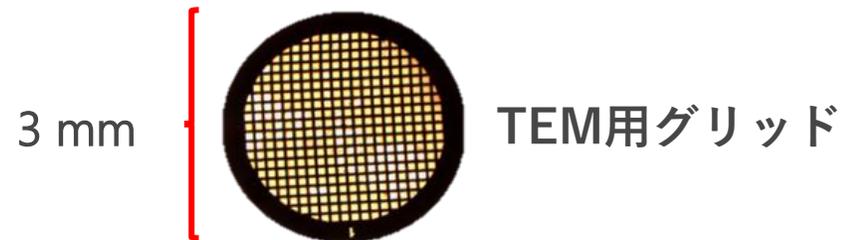
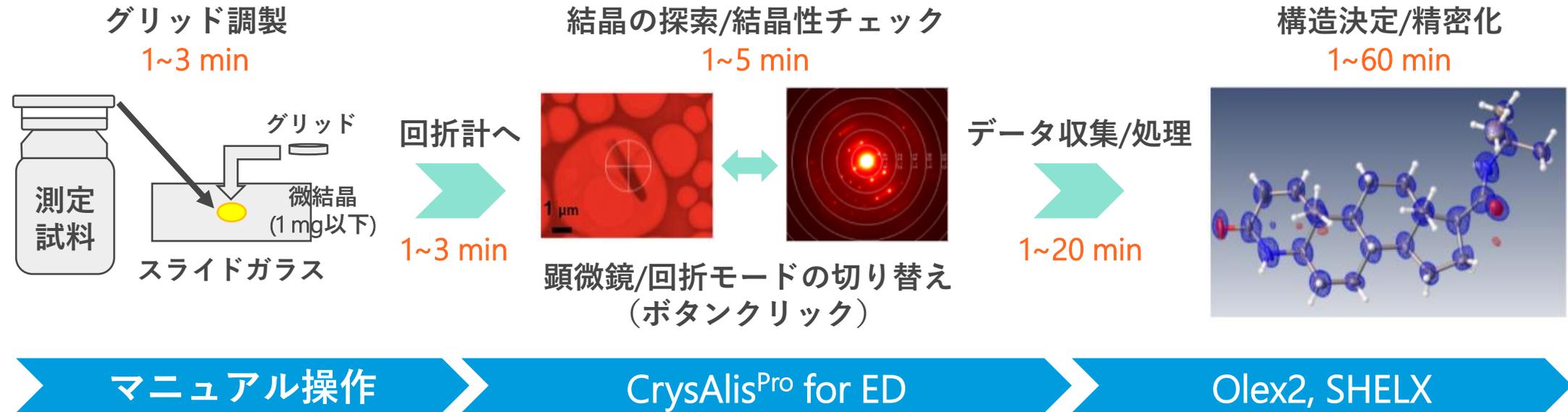
X線回折では困難な、サブミクロン結晶による三次元分子構造の決定を、手軽に行える電子回折統合プラットフォーム。単結晶構造解析の知識があれば、電子回折による構造解析をすぐに開始可能。

Synergy-EDによる構造解析の流れ

- CrysAlis^{Pro} for EDはデータ測定、処理、構造解析を同時進行で実行



具体的な測定の流れ：試料調製から構造決定まで



データの質を向上させるための新機能を搭載

・データMerge機能



1つのサンプルのみのデータでは、データの完全性 (Completeness) が不十分



複数のサンプルデータを合わせることで、データの完全性を補う

・Flash機能 (サンプルのダメージを低減)



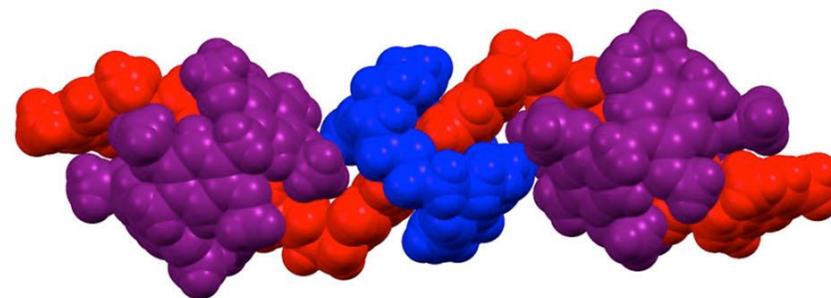
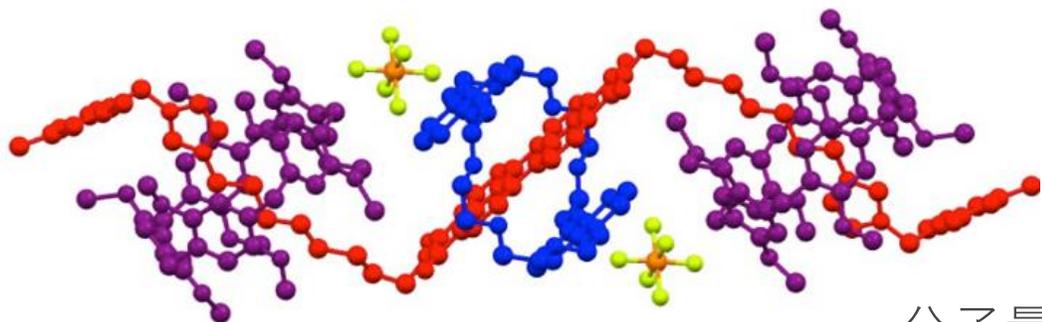
グリッドから良質な結晶を電子顕微鏡で観察しながら探さなければならない

各探索ポイントでスナップショットを撮影し、それを確認しながらサンプルを選別する

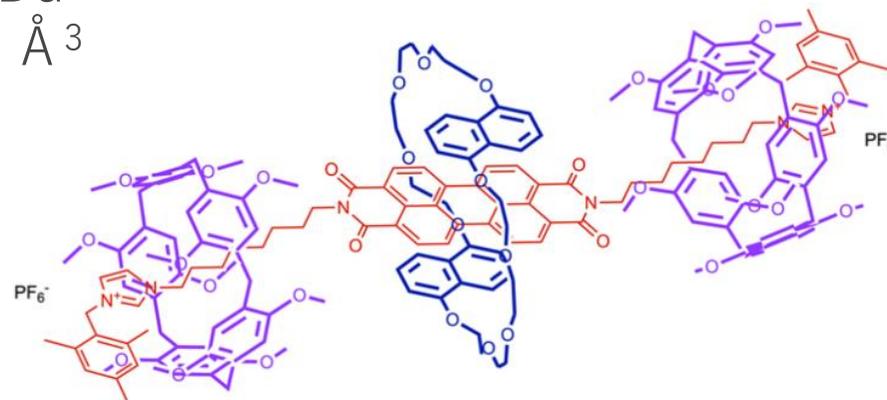
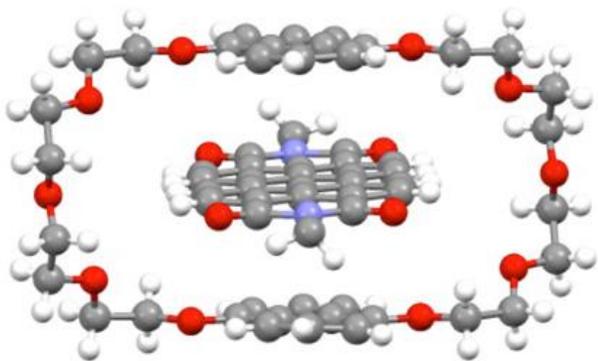
構造解析例

超分子化合物の構造解析例

- 巨大分子[4]ロタキサンの構造決定に成功



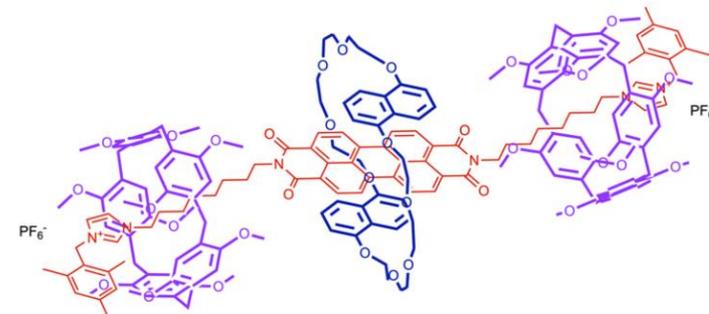
分子量 \approx 3500 Da
 格子体積 5000 \AA^3
 空間群 $P-1$



N. Pearce, *et al.*, *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 415.

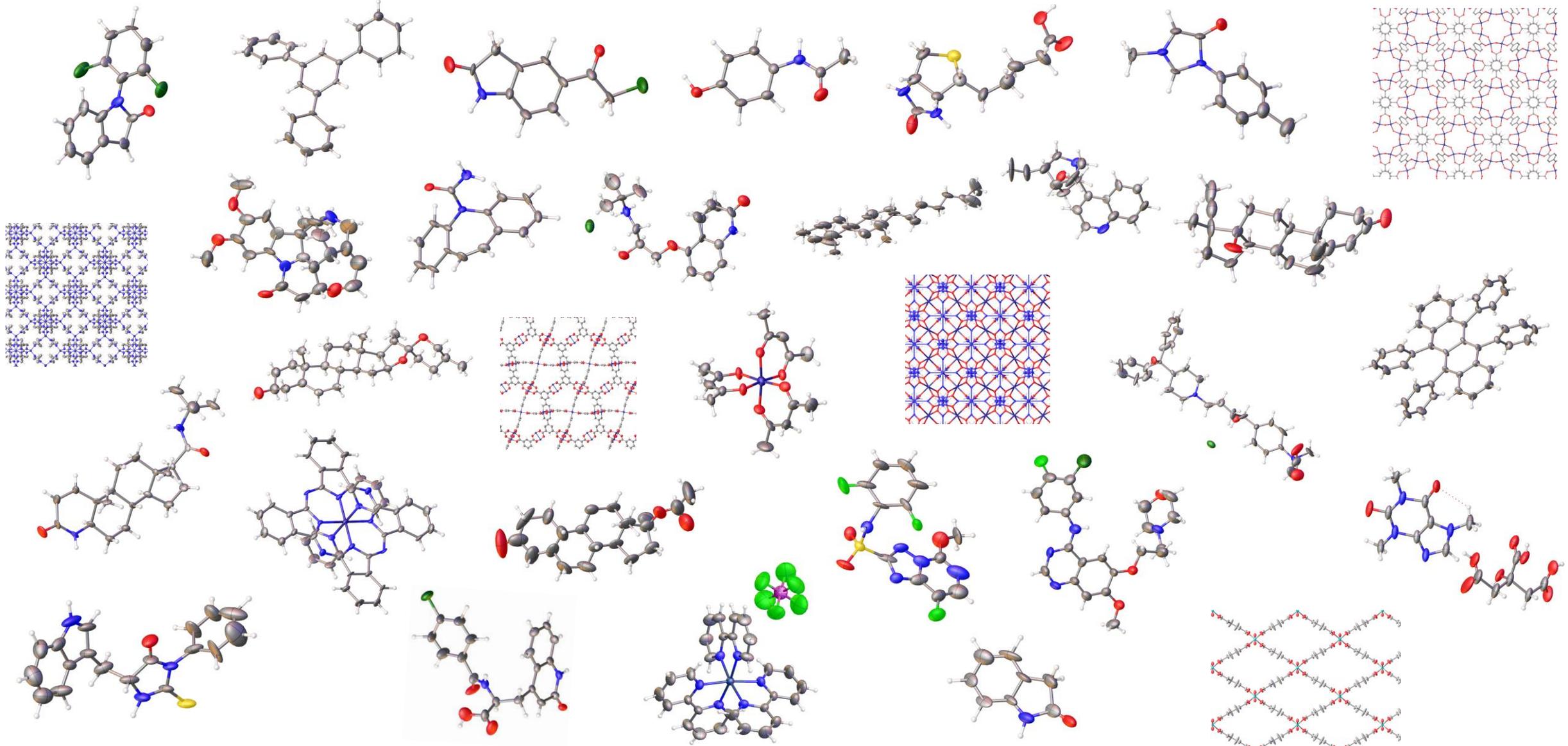
放射光測定データとの比較

- 放射光よりさらに小さい結晶で、より高品質の
[4]ロタキサンの構造解析結果を得ることに成功



装置・設備	結晶サイズ	結晶構造	束縛命令	精密化の詳細
	数 μm		123 DFIX 125 DANG 54 SADI 92 FLAT	分解能 1.3 Å 反射数 4766 パラメーター数 933 一部原子を配置できず 予想構造を元に原子を 配置して精密化
	<0.1 μm		0 DFIX 0 DANG 88 SADI 0 FLAT	分解能 1.0 Å 反射数 9201 パラメーター数 1035 全ての原子を配置 ab initio法で原子を配 置して精密化

N. Pearce, *et al.*, *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 415.



Research Article
Rational Design and Assembly of Molecular Building Units into Metal-Organic Frameworks for Inverse Catalysis

Hakuhybotrol, a polyketide produced by Hypomyces pseudocorticicola, characterized with the assistance of 3D ED/MicroED
February 2023 · Organic & Biomolecular Chemistry 21(11)
DOI: 10.1039/d2ob02286a

Yoshihiro Watanabe · Shuhei Takahashi · Sho Ito · Masato Iwatsuki · Show all 15 authors · Synlett
DOI: 10.1055/s-0042-1751527

Electron Crystallography

Improving the Quality of Crystallographic Data

Liang Wang, M. Cristina D. Mallia, and D. ...

Communication

Fine Pore-Structure Engineering by Ligand Conformational Control of Naphthalene Diimide-Based Semiconducting Porous Coordination Polymers for Efficient Chemiresistive Gas Sensing

Dr. Ziqian Xue, Dr. Jia-Jia Zheng, Dr. Yusuke Nishiyama, Dr. Ming-Shui Yao, Dr. Yoshitaka Aoyama, Zeyu Fan, Dr. Ping Wang, Prof. Takashi Kajiwara, Prof. Yoshiki Kubo, and Prof. ...
First published: 15 November 2022 | <https://doi.org/10.1002/anie.202211111>

Aljaž Škrjanc, Martin Gazvoda, and Nataša Zupan

White qbe Rod Se...
Chemical Synthesis

research papers

A Journal of the German Chemical Society

International Porous Ladder...
Wang, and Zhenjie Zhang*

Catalysis in Germany

Alternative Epoxidation Reactions Catalyzed by...
Complexes with a Hydrogen-Bonding Site

An oxidative photocyclization approach to the synthesis of Securiflustra securifrons alkaloids

BRANDON W. ALEXANDER · NOAH M. BARTFIELD · VAANI GUPTA · BRANDON Q. MERCADO · MARK DEL CAMPO · AND SETH B. HERZON

SCIENCE · 22 Feb 2024 · Vol 383, Issue 6685 · pp. 849-854 · DOI: 10.1126/science.adg167

Christian R. Göb...

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

View Article Online
View Journal | View Issue

Spin-state dependent pressure responsiveness of Fe(II)-based triazolate metal-organic frameworks*

Silva M. Kronawitter, Richard Röß-Ohlenroth, Sebastian A. Hallweger, Marcel Hirle, Hans-Albrecht Krug von Nidda, Tobias Luxenhofer, Emily Myatt, Jem Pitcairn, Matthew J. Cliffe, Dominik Daisenberger, Jakob Wojciechowski, Dirk Volkmer, and Gregor Kieslich

Enna...
Abstraction and...

Yoshitaka Ashitani, Yoshiki Kubo, Ken-ichi Otake, and Ken-ichi Otake

GDCh

From a Molecular Complex to a M-HOF and a MOF

Andrichs, and Norbert Stock*

6/6
8
Citations
LEARN ABOUT THESE METRICS

Share Add to Export RIS

RESEARCH ARTICLE

Share Add to Export RIS

絶対構造の決定

単結晶X線構造解析による絶対構造決定

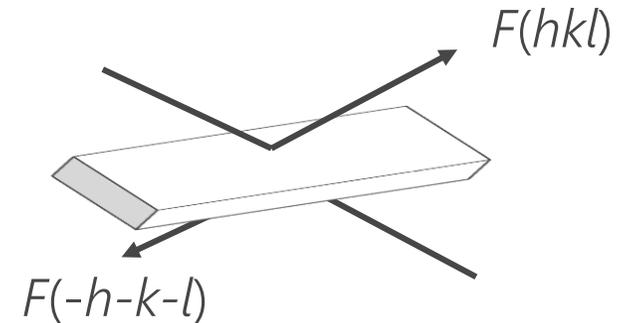
- X線回折の異常分散効果を用いて、Flackパラメーターを用いた精密化を行うことで絶対構造（絶対配置）を判定できる

結晶に対称中心があり、異常分散がないとき

$$|F(hkl)| = |F(-h-k-l)| \quad \text{Friedelの法則}$$

結晶に対称中心がなく、異常分散があるとき

$$|F(hkl)| \neq |F(-h-k-l)| \quad \text{Friedelの法則が破れる}$$



- 電子回折では多重散乱の影響が大きいため、Flackパラメーターを用いて絶対構造を判定することができない

電子回折データを用いた絶対構造決定

いくつかの方法が提案されている

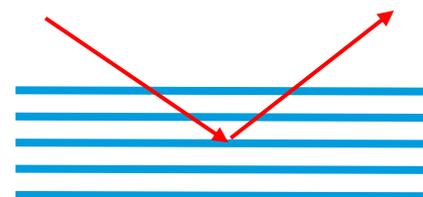
- **結晶構造と高分解TEM像を比較**
→ 高度な専門知識が必要/適用可能な化合物が限定的
- **絶対構造が既知の化合物と塩/共結晶を作製**
→ 適用可能な化合物が限定的
- **多重散乱を考慮したデータ処理/構造精密化**
→ 最も汎用的な方法

多重散乱を考慮したデータ処理/解析

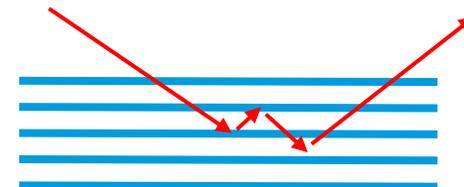
絶対構造の決定：Friedel則の破れを利用

$$I(hkl) \neq I(-h-k-l)$$

X線回折：異常分散
電子回折：多重散乱



多重散乱なし
 $|F|^2 \propto |I|$



多重散乱あり
 $|F| \propto |I|$

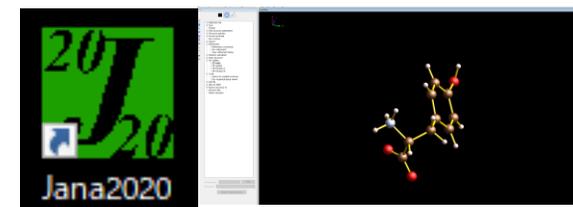
電子回折の絶対構造決定フロー



多重散乱を考慮した
データ処理



Olex2 (SHELX)による
結晶構造の決定

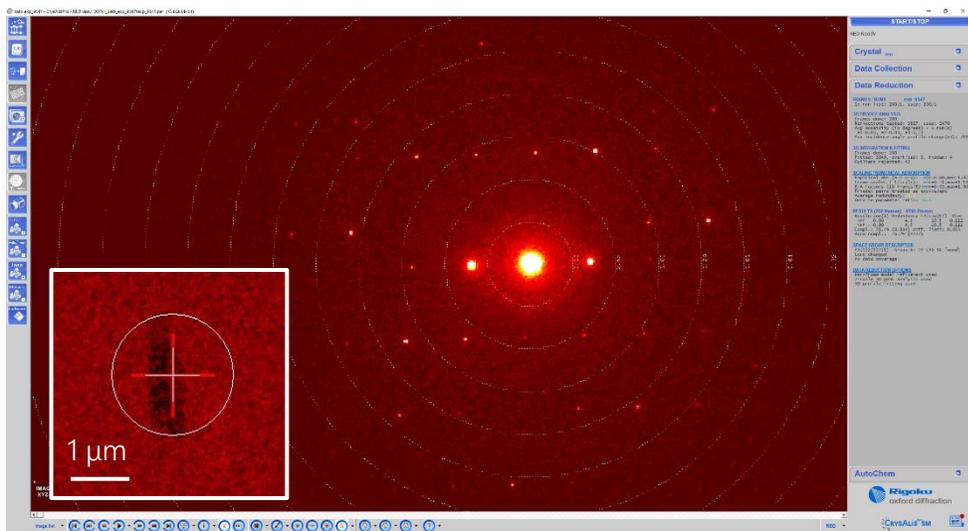


Jana2020^{*1}による多重散乱を
考慮した精密化

*1 DOI: <https://doi.org/10.1515/zkri-2014-1737>

絶対構造決定例：チロシン

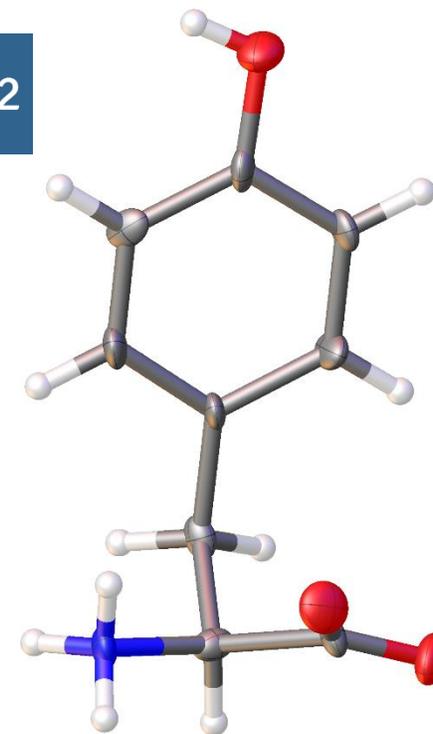
CRYSTALIS^{PRO} ED



多重散乱を考慮したデータ処理

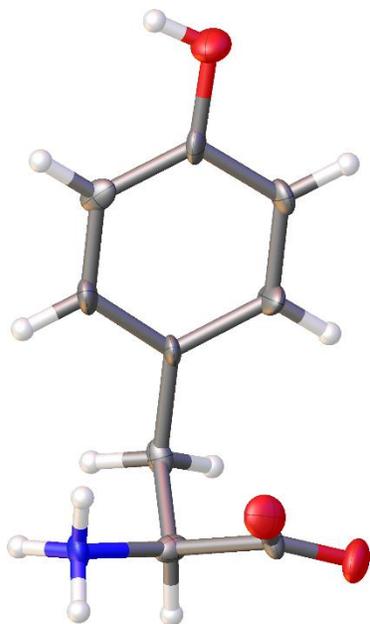
OlexSys | Olex2

R_1 10.79 %
 wR_2 30.11 %



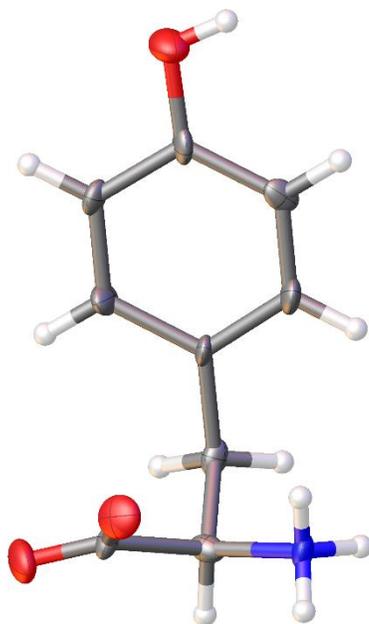
多重散乱を考慮しない構造解析

絶対構造決定例：チロシン



L-チロシン

R_1	8.30	%
wR_2	21.55	%



D-チロシン

R_1	13.17	%
wR_2	32.96	%

市販品のL-チロシンを測定



原子座標と温度因子を固定の上
手系のみを反転し、
多重散乱を考慮した精密化



L体のR値 < D体のR値

絶対構造決定例：クラリスロマイシン

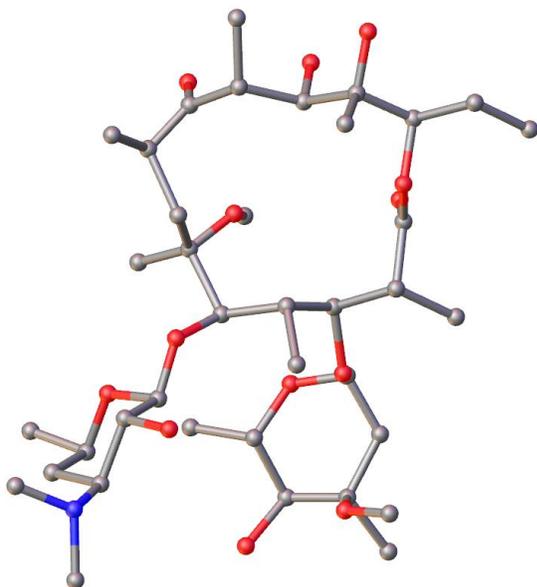
市販品のクラリスロマイシンを測定



原子座標と温度因子を固定の上
手系のみを反転し、
多重散乱を考慮した精密化

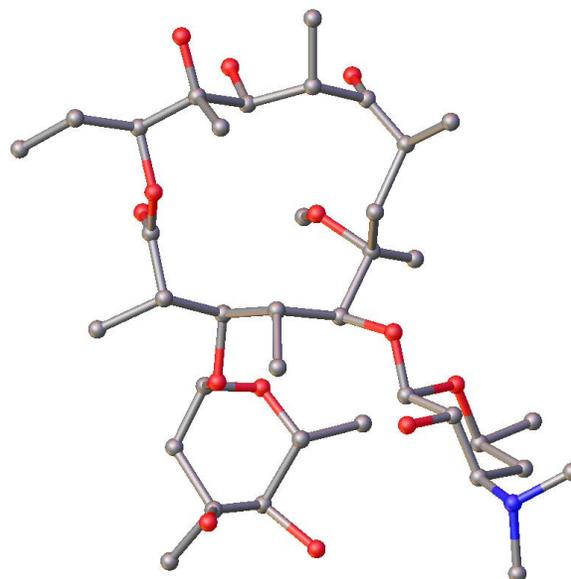


R値を比較



正しい絶対配置

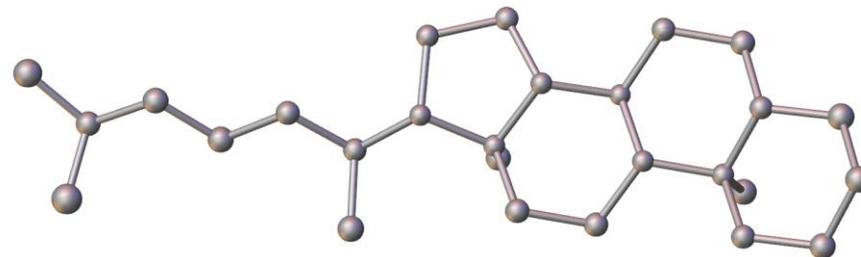
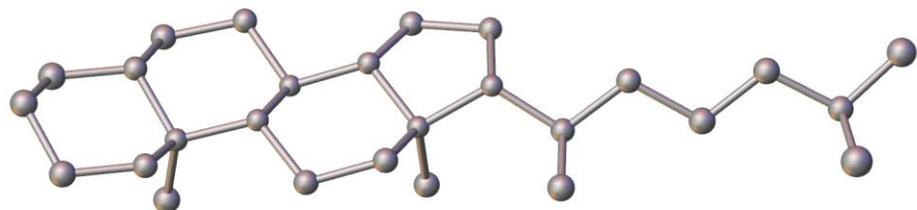
R_1	12.99	%
wR_2	25.72	%



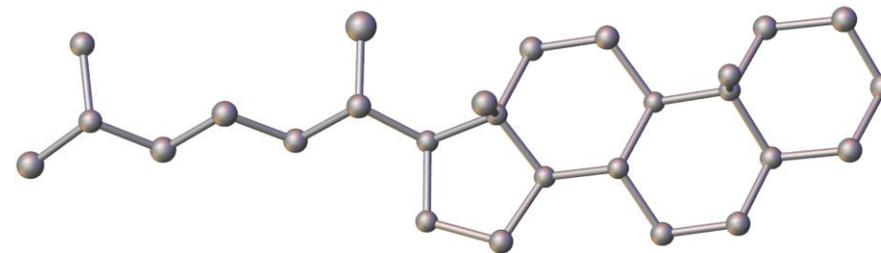
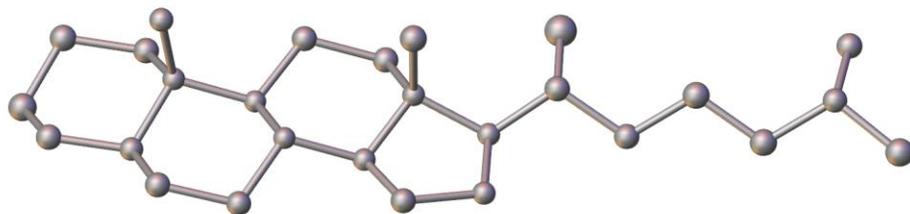
逆の絶対配置

R_1	16.68	%
wR_2	31.28	%

絶対構造決定例：コレスタン



2分子/非対称単位



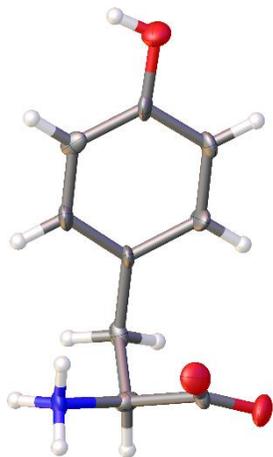
R_1 **12.55** %
 wR_2 **26.79** %

空間群: $P2_1$
 Completeness: **55%**

R_1 **15.88** %
 wR_2 **32.44** %

Olex2による絶対構造決定（β版）

- 化学者にとってJana2020は扱いやすいとはいえず、手順も煩雑
- **Olex2上で完結する絶対構造決定プログラムを開発**



多重散乱を
考慮しない
構造解析

多重散乱を
考慮した
精密化

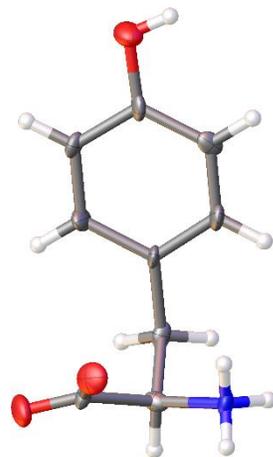


OlexSys | Olex2



正しい絶対配置

R_1 9.04 %
 wR_2 20.18 %



逆の絶対配置

R_1 12.70 %
 wR_2 28.16 %

$I_{\text{calc},1}$ VS. I_{obs}
 $I_{\text{calc},2}$ VS. I_{obs}
→ Z-score

Z-score = 15.72

まとめ

- Synergy-EDを用いることで、X線で測定できないサイズの微粒子結晶が測定可能
 - 1 μm 以上の単結晶が得られない新規化合物の構造決定
- 多重散乱を考慮した精密化を行うことで、電子回折でも絶対構造を決定することが可能
- Olex2上で完結する絶対構造決定プログラム（ β 版）を開発

JASISスクエアのご案内

- **SQ-A11** にて、スペラファーマ株式会社様と共同発表
9/5 (木) 14:30-15:30
展示場 7ホール
- 3D ED/MicroED結晶構造解析のご紹介
『**低分子医薬品の結晶多形&天然物の構造解析事例について**』
- 3D ED/MicroED結晶構造解析のご紹介
『**Synergy-EDを用いたサブミクロン結晶の測定と応用**』



お問い合わせは

株式会社リガク

プロダクト本部



042-545-8111

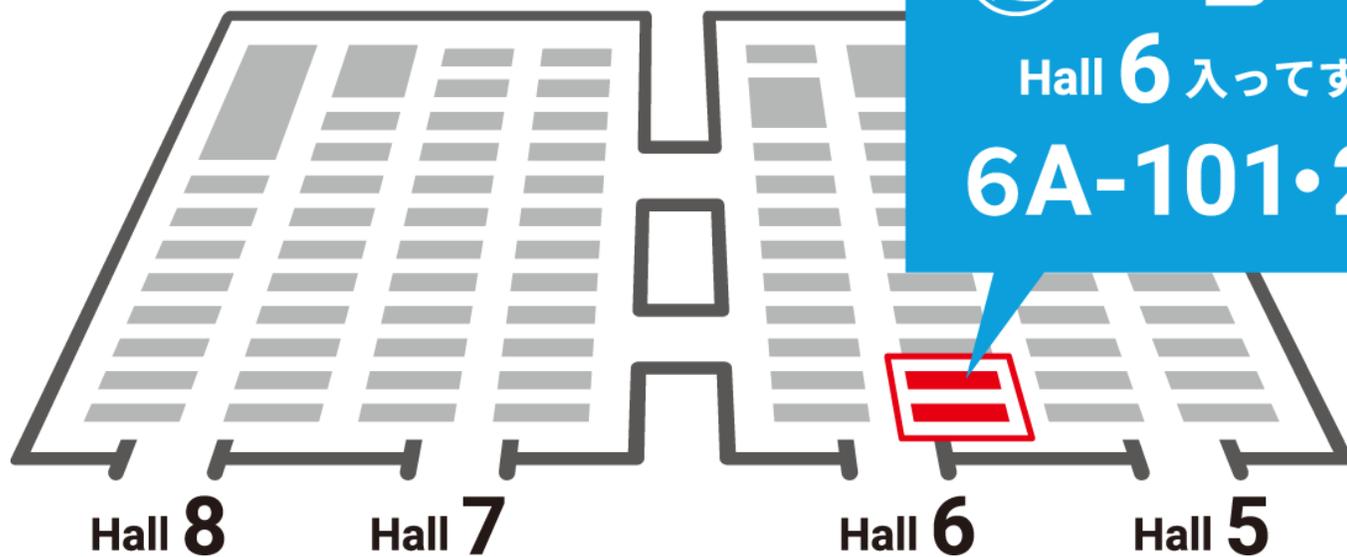


info@rigaku.co.jp



www.rigaku.com

是非リガクブースへ
お立ち寄りください！



 Rigaku
Hall 6 入ってすぐ！
6A-101・201



