

# 日本医療研究発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：結晶スポンジ法を活用する超速天然物ライブラリ構築と活性スクリーニング

Construction of an ultra-fast natural product library and activity screening using crystalline sponge method

研究開発実施期間：平成 30 年 5 月 1 日～令和 5 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：佐藤 宗太

Sota SATO

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東京大学 大学院工学系研究科応用化学専攻 特任教授

Department of Applied Chemistry, School of Engineering, The University of Tokyo, Project Professor

## II 研究開発の概要

本研究では、「結晶化を必要としない X 線結晶構造解析手法である結晶スポンジ法、以下 CS 法 (Crystalline Sponge Method, *Nature* **2013**, *495*, 461)」の特徴を活かし、創薬技術としての天然物超速ライブラリ構築や活性スクリーニング手法の創出を目指した。具体的には、1) CS 法に立脚して、天然物化学研究における単離・構造決定工程の 2 桁以上の微量化と結晶化工程を省くことによる迅速な X 線構造解析をはかり、そのワークフローを一新した。2) 新規天然物入手にゲノム情報探索を取り入れ、構造決定が律速となっている合成生物学研究を劇的に加速し、新規天然物ライブラリを超速構築した。3) さらには、複雑な天然物抽出エキス (混合物) の CS 結晶への吸蔵を活性スクリーニングと組み合わせた、新しい迅速な活性成分探索手法を開発した。

なお、本研究は概念検証を中心とする基礎研究の提案であり、新しい研究概念の提唱とその実証を目指した。そのため、実施例の数を競う性質の研究ではなく、従来法では達成できなかった研究成果を新たに示すことに注力した。また、研究開発課題名にある「ライブラリ」は、医薬品候補化合物の探索のソースのための大規模な化合物セットのことを総称している場合がある。しかし、分野によってその意味する内容が異なるために、我々が捉えている「ライブラリ」の概念を追記概説する。合成化合物においては、既知の分子を連結することで構造変換して新しい分子を生み出すために、構造要素が偏りがちであり、ケモインフォマティクスにおける概念である「化学空間 (ケミカルスペース)」の観点からすると多様性に乏しい。一方で、天然物からは広大な化学空間に所属する分子が見いだされてきている。この構造多様性から生じる広範な化学空間という概念から捉えた化合物群を「ライブラリ」とし、未知の化合物が存在する「ライブラリ」から新規化合物は探索されてきた。しかし、従来型の大量の天然物を採取して新規化合物を発見する手法は、天然物資源が採掘されつくしてほぼ枯渇したため

に、限界を迎えていると考えている。そこで本研究では、化学空間という概念から捉えた化合物の「ライブラリ」を拡充するため、合成生物学の手法を取り入れ、天然物からは発見しにくい非天然型の天然物化合物をゲノム情報探索によって生産することにより、ライブラリを充実させる。つまり、このライブラリ構築のための新手法の概念を証明することが本研究開発課題の目指すものであり、CS 法を組み合わせることで、微量の化合物分析を超速で実施できることを明らかにする。それゆえ、大量の化合物をストックして提供可能とする「ライブラリの構築」とは、趣旨が異なる。

本研究の成果とその意義を述べる。

#### 1) 天然化合物単離構造決定のワークフローの一新

CS 法そのものは、2013 年の最初の報告の後、天然物化合物の構造解析における有用性が示されてきており、ある程度、完成度が高い手法である。本研究では、迅速性の向上と、創薬分野での利用を念頭に、解析が難しい化合物への適用範囲の拡大を目指した。天然物への CS 法の適用にあたっては、解析対象分子を溶液として結晶スポンジに染み込ませる（ソーキングする）工程において、クロロホルムや塩化メチレン、ヘキサンといった低極性有機溶媒がよく用いられてきた。創薬を目指すことを念頭におくと、C、H、O 原子からなる脂溶性分子よりも、N 原子を多く含む極性分子群の解析手法の確立が重要であり、従来用いられてきた溶媒への溶解度が低い極性化合物は、原理的に CS 法による解析が難しい。結晶スポンジの結晶性を損なわず、ソーキング可能な溶媒条件を探索した結果、アセトンや 2-ブタノン、メチル tert-ブチルエーテルを利用できることを見だし、解析対象化合物の多様性を拡大することができた。また、副次的な効果として、結晶スポンジ内にこれらの極性溶媒分子も取り込まれることで、解析対象分子の配向が定まり、ディスオーダーが解消することで、解析精度・確度を向上できることがわかった。さらに、本課題を提案した際には想定できなかった成果が挙げられた。すなわち、従来用いられてきた 50~200  $\mu\text{m}$  程度の大きさの CS ではなく、1~10  $\mu\text{m}$  程度の大きさのマイクロ CS を使うことで、従来法では適用不可能だった化合物を高精度に解析できることがわかってきた。また、脆い CS を直接ハンドリングすることなく、キャピラリー内やプレート上で測定する手法も開発できた。また、高極性で分子量が大きな化合物にも適用できる CS が見つかってきており、CS 法の改良検討を積み重ねられた。さらに、近年では、CS 法のソーキング条件を解析することで、構造解析可能な構造の特徴分類を行う検討も進んできている。これらの成果により、今後、技術導出先での CS 法の技術的理解と実用化が進むと期待される。

上記のように高度化した CS 法を用い、天然物化学研究における単離・構造決定工程の 2 桁以上の微量化と結晶化工程を省くことによる迅速な X 線構造解析をはかり、そのワークフローを一新した。天然から化合物を抽出し、単離生成して構造決定しようとする、従来、kg オーダーの大量の生体を採取して、そこから抽出・単離操作を行い、NMR と MS を使った煩雑かつ時間のかかる構造解析を経て分子構造が相対配置として得られていた。さらに、結晶試料の調製に成功した場合には絶対構造の決定ができるが、NMR と MS に特化した解析を行う研究者が多いために、単結晶 X 線回折実験までは実際には検討できないという状況が少なく無い。本研究では、最初の段階で CS によって抽出を行い、逆抽出によって試料を調製する親和性スクリーニングを導入することにより、天然物の取得から構造決定に至る速度を加速する独自の手法を探索した。親和性スクリーニングにより、分離する対象化合物群を絞り込むことで単離操作の上流で試料量を減らすことができ、かつ、絞り込まれた化合物群は CS にソーキングできることが保証されているため、後工程での CS 法による構造解析の成功確率が格段に上げられることが利点である。実際に、大量のサンプルを必要とする場合が多い天然物の構造決定に至るワークフロー全体のスケールを下げる検討を行った。近年の遺伝子解析技術の発展を背景に、生合成遺伝子を導入した遺伝子組換え微生物を用いて天然物を生産させることが容易になり、天然から直接サンプルを採取せずに天然物

を取得する方法が現実的になっている。しかし、このような手法を用いた場合でも、遺伝子ごとに手間のかかる最適化を行わなければ、必ずしも高収量は達成されない。そのため、特定遺伝子由来の天然物を同定するためには、多くの場合、数リットルから数十リットルに及ぶ遺伝子組換え微生物の培養が依然として必要である。今回、結晶スポンジ法を「単離精製」と「構造決定」の両方に用いることで、小葉植物の遺伝子に由来する天然物を、少量の培養液を用いて構造解析する検討を行った結果、従来法のおおよそ 1/100 にあたる、わずか 25 ml の培養液から、天然物であるテルペン化合物の構造決定に成功した。

## 2) CS 法+合成生物学手法による超速ライブラリ構築

天然物からは、人工合成では作り得ない、広い化学空間に位置づけられる多様な骨格をもつ分子構造が得られ、数々の創薬リード化合物が発見されてきた。しかし、天然物化学の円熟に伴って近年では新化合物の発見に限界が見えてきており、天然物分子の資源が枯渇したと言える状況にある。この事態を、ゲノム情報探索によって根本的に打開する合成生物学手法により、全く新しい、自然界にはごく微量しか存在しないために発見できない「天然物分子」を量産したり、または、自然界には生合成経路が存在しない「天然物分子」を異種生物の酵素を組み合わせることで合成したりできるようになった。この手法を活用し、迅速な構造決定法である CS 法を利用することで、従来の天然物化学では構築できなかった、多様な骨格のライブラリを極めて速い速度で構築する方法論を示すことをめざして検討を重ねた。ゲノム編集技術を研究室内にて実施できる体制を整え、例えば、NMR では解析が困難であり、そもそも結晶化ができない油状化合物の構造解析を達成した。また、独特な骨格構造を有する化合物を見出すにいたり、化学空間を拡張することができた。これらの構造解析は 1 ヶ月程度で完了できることが多く、従来、多くの労力と長い時間を要した構造解析の作業を圧倒的に短縮することに成功した。さらに、当初の研究計画時には想定していなかった、ゲノム編集によって発現させた酵素の放射光 X 線構造解析にも成功し、酵素機能のより根源的な理解に至った。

## 3) CS 法を用いる迅速活性スクリーニング

1)項に記載した親和性スクリーニングを基盤として、活性を有する物質を選択濃縮する活性スクリーニングを組み合わせる検討を行った。抗ウイルス作用や免疫活性化作用を有することが知られている食品に含まれる化合物群に対して、CS による親和性スクリーニングを実施したところ、混合物の中から特定成分のみを抽出できることがわかった。用いる CS の種類や溶媒等の条件によって化合物選択性が制御できることがわかってきた。選択抽出できた化合物群に対して酵素活性試験を実施したところ、活性が高くなり、混合物から活性濃縮できたことを実証できた。今後、この概念検証できた検討を基盤として、創薬における活性スクリーニングの手法として適用することで新しい、迅速な活性成分探索手法になることが期待される。

In this study, we aimed to leverage the unique features of the Crystalline Sponge method, abbreviated as CS method (Crystalline Sponge Method, *Nature* **2013**, 495, 461), which is an X-ray crystallography technique that does not require crystallization. Our goal was to develop a rapid X-ray structure analysis method and screening approach for natural product drug discovery. Specifically, we accomplished the following:

1. After its initial report in 2013, the CS method itself has demonstrated its utility in the structural analysis of natural compounds and is considered a well-established technique to some extent. In this study, we focused on enhancing its speed and expanding its applicability to challenging compounds, with the intention of facilitating its use in the field of drug discovery. Building upon the advanced CS method, we first extracted natural products by CS (affinity screening). With the reduced amount of starting materials, we achieved rapid X-ray structure analysis, thereby enabling the analysis of minute quantities in natural product chemistry. This revolutionized the workflow of structure determination.

2. By incorporating genomic information mining into the acquisition of novel natural products, we dramatically accelerated the bottleneck of structure determination in synthetic biology research, leading to the ultra-fast construction of a novel natural product library. We have successfully achieved the structural analysis of oily compounds, that are challenging to analyze using NMR and cannot be crystallized. Furthermore, we have discovered compounds with unique skeletal structures and expanded the chemical space. These structural analyses can often be completed within approximately one month, significantly shortening the laborious and time-consuming process that was conventionally required for structure determination. Additionally, we have achieved unexpected success in the X-ray crystallography analysis of enzymes expressed through genome editing, leading to a deeper understanding of enzyme functionality at a more fundamental level, which was not initially anticipated in our research plan.

3. Furthermore, we developed a new and rapid approach for the discovery of bioactive compounds by combining the encapsulation of complex natural product extracts (mixtures) into CS crystals with activity screening. We conducted a study combining affinity screening and activity screening, aiming to selectively concentrate substances with activity based on their affinity. In the case of compounds present in foods known to have antiviral and immune activation effects, we performed affinity screening using CS and found that specific components could be extracted from the mixture. It has been discovered that compound selectivity can be controlled by the type of CS used and the conditions such as solvent. When enzyme activity assays were conducted on the selectively extracted compound group, high activity was observed, demonstrating the successful concentration of active compounds from the mixture. Based on the successful proof-of-concept in this study, it is expected that this approach can be applied as a new and rapid method for activity screening in drug discovery.