

# 3D ED/MicroED専用機 XtaLAB Synergy-EDによる ナノサイズ結晶構造解析

伊藤 翔\*, 山野 昭人\*\*

1  $\mu\text{m}$ 以下のナノサイズ結晶から単結晶構造解析が可能なMicroED/3D EDが注目を集めている。本稿では、著者らがこれまでにに行った測定例および応用例を中心に紹介する。

## 1. はじめに

単結晶構造解析に必要な最小の結晶サイズはどの程度だろうか？この質問への答えは、時代と使用する線源によって異なるが、現在では、実験室系装置および放射光のどちらにおいても、X線による単結晶構造解析では1–10  $\mu\text{m}$ 程度の結晶から構造決定が可能である。しかしながら、1  $\mu\text{m}$ 以下の結晶の測定は依然として困難である。繰り返し結晶化を試みたにもかかわらず、結晶化がうまくいかない、もしくは1  $\mu\text{m}$ 以上の結晶が作成できないことは頻繁にあり、構造情報を必要とする研究者にとって大きな障壁となってきた。近年、この状況を打破する手法として、電子線を入射線源に使用した3D ED/MicroEDが注目を集めている。本稿では、3D ED/MicroEDによる解析例および応用例を中心に紹介する。また、3D ED/MicroEDに関しては、いくつかのグループがほぼ同時期に本手法に関する論文を公開したため、多くの呼称が存在するが、本稿では3D ED/MicroEDで統一する。

## 2. なぜ電子線か

上述の通り、電子線を用いれば1  $\mu\text{m}$ 以下の結晶であっても構造決定が可能である。これはX線と比較して、電子線の散乱断面積が $10^5$ から $10^6$ 程度大きく、物質との相互作用が強いためである<sup>(1)</sup>。一方で、物質との相互作用が強いということは、その分入射電子線に対して試料の損傷が激しいことを意味する。このため近年まで3D ED/MicroEDの適用が電子線損傷に強い無機化合物等に限定されていたことから、一般的な構造決定に使用されることはまれであった。しかしながら、検出器の技術革新により1光子または1電子を直接検出可能になった現在、状況が一変した。測定試料の

損傷を抑えるために、入射電子線の強度を非常に弱くしても、構造解析に必要な回折強度が得られるようになったのである。これにより、有機低分子や蛋白質などの電子線損傷を受けやすい試料に対しても、3D ED/MicroEDによる構造決定が可能となった<sup>(2)</sup>。ほぼすべての結晶性試料が3D ED/MicroEDの測定対象となったことから、近年改めてこの手法が大きな注目を集めている。実際、2018年にはScience誌のBREAKTHROUGH of the YEARにも、3D ED/MicroEDによる構造決定に関する論文が選出された<sup>(3)</sup>。

3D ED/MicroEDの測定需要の増加に反して、この手法による測定および解析はそれほど容易ではない。これまでは、主に汎用の透過型電子顕微鏡の一つの機能として回折実験を行うことが多かったが、装置の的確な調整や測定には電子顕微鏡の専門家が必要になるため、X線構造解析用装置に比べハードルが高かった。このような状況を打破するため、リガクと日本電子の共同開発により、誰もが容易に測定・解析可能な3D ED/MicroED実験の専用機であるXtaLAB Synergy-ED (以下、Synergy-EDとする)が開発された<sup>(4)</sup>。Synergy-EDは、通常の透過型電子顕微鏡と異なり、3D ED/MicroEDのための最適な装置設計がされた専用装置である。本稿ではSynergy-EDを用いた測定および解析例を中心に紹介する。

## 3. 測定・応用例

### 3.1. ロタキサン<sup>1</sup>の構造決定

著者らはこれまでにSynergy-EDを用いて、250以上の化合物の構造決定を行ってきた。それらの多くは結晶サイズが1  $\mu\text{m}$ 以下の結晶であったが、3D ED/MicroEDは、X線で測定可能なサイズの結晶に対しても有効な場合がある。X線では構造決定には十分でない3 Å分解能程度の回折しか得られない場合、結晶を破碎しサイズを小さくした上で3D ED/MicroEDで測定をすると構

\*株式会社リガク 応用技術センター ROD(単結晶解析)グループ

\*\*株式会社リガク 応用技術センター

造決定が可能となることがある。著者は英国バーミンガム大学およびノッティンガム大学との共同研究として、ロタキサンの(分子量約3500 Da)の構造決定をSynergy-EDで行った<sup>(5)</sup>。当初は放射光を用いて構造決定を試みていたが、1.25 Åまでの回折しか得られず、直接法による構造決定は困難であった。また、対イオンのヘキサフルオロリン酸イオンもモデリングが不可能であった。そこで、放射光で用いた結晶と同一バッチの結晶を用いてSynergy-EDで測定を行った。その結果、1 Å分解能でのデータが得られ、直接法による構造決定に成功した(図1)。また、差フーリエマップから対イオン由来のピークが明瞭に観測されたため、対イオンのモデリングも可能であった。放射光による単結晶X線構造解析が非常に重要である手法であることは議論の余地がないが、放射光をもってしても中程度の回折能しか得られない結晶に対して、今回のロタキサンの構造決定は、3D ED/MicroEDが極めて有効であることを示す好例であろう。

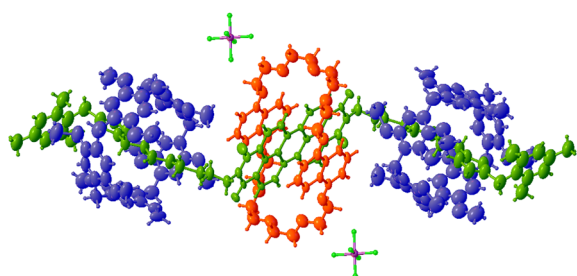


図1. Synergy-EDを用いて決定したロタキサンの構造。

### 3.2. 錠剤中における微結晶の直接測定

上市されている低分子医薬品中の有効成分の多くは結晶であることが多いため、有効成分の分子構造を結晶構造解析により決定し、パッキング等の情報から溶解度などの物性研究がさかんに行われている。しかしながら、製品中の結晶は微結晶であることが多く、結晶を直接単結晶X線構造解析で構造決定することが困難である。そのため、有効成分を再結晶し構造決定を行うしかないが、結晶化条件の違いにより、製品中の結晶とは晶系が異なり、物性の議論が困難になることが問題とされていた。このような場合においても、Synergy-EDを用いた微結晶の構造解析が威力を発揮する。著者は、アレルギー性鼻炎の市販薬を用いて測定を行った。錠剤を軽く砕き、そのまま測定を行ったところ、5分程度で有効成分の構造決定に成功した。測定時間の短さも3D ED/MicroEDの長所である。また、添加物と思われる化合物の構造や(図2)、賦形剤由来の鎖状物質特有の回折も得られた。

アレルギー性鼻炎薬以外にも、いくつかの市販薬を用いて同様の実験を行ったところ、試したすべての市販薬の有効成分の構造決定を行うことができた。

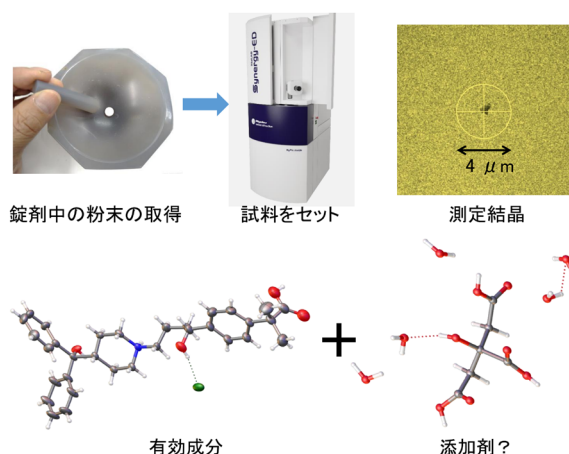


図2. 医薬品(錠剤)中における化合物の構造決定。錠剤を破碎し測定した(上段)。測定結晶の厚みはおおよそ500 nmであった。有効成分および添加剤と考えられる化合物の構造(下段)を示す。

Synergy-EDでの微結晶測定により、従来の有効成分の再結晶化が必須なX線を用いた構造決定よりも、大幅に構造決定までにかかる時間と労力が短縮されることから、研究開発全体の迅速化に貢献できると考えられる。

### 3.3. 定量分析

3D ED/MicroEDでは微小結晶の測定が可能であるため、粉末X線回折で用いられるような結晶サイズの測定も可能である。さらに、1つの結晶にかかる測定時間も短いため、グリッド上にセットした多数の結晶を順次測定すれば、定量分析が可能である。加えて、結晶構造決定も可能であるため、格子定数の差などの、個々の結晶の“個性”もとらえることができる。コロナウイルス感染症用の解熱鎮痛剤としても多用されているアセトアミノフェンは、いくつかの結晶多形を持つことが知られている<sup>(6)</sup>。室温では、ほぼ全ての結晶がForm 1として存在するが、加熱融解および降温後に再結晶を行うと、Form 2の結晶多形が生じることが知られている。その他、Form 3およびForm 4も多形として確認される。定量分析として、XRD-DSCアタッチメントにより加熱融解、降温および再結晶化したアセトアミノフェンを用いて測定を行い、各結晶多形の存在比率を求めた。測定にはSynergy-EDの制御兼解析ソフトウェアであるCrysAlis<sup>Pro</sup> for EDに備わっている機能の1つである、「queue」を用いた。queueは事前に測定する結晶の位置を指定しておけば、データ収集を自動で行う、半自動測定機能である。また、測定のみでなく、CrysAlis<sup>Pro</sup> for EDのスクリプト機能を用いてデータ処理および構造決定も半自動で行うことが可能である。定量分析の結果を図3に示す。

計200結晶を測定し、そのうち100結晶で構造が得られた。粉末回折パターンから予想されたように、加熱により、室温で最も安定であるForm 1の存在比はわずか10%となっていた。これに対し、Form 2およ

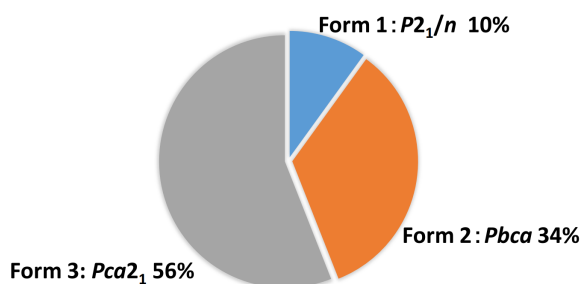


図3. アセトアミノフェンの定量分析の結果。測定した200結晶のうち、100結晶の構造が自動で決定された。

びForm 3がForm 1よりも多く存在することがわかった。各多形の存在比率に加え、それぞれの結晶多形の構造も自動で決定され、物性の議論を行うことも可能であった(図4)。今回は医薬品であるアセトアミノフェンの定量分析を行ったが、材料科学などの分野においても、Synergy-EDを用いた構造決定を同時に行う定量分析が威力を発揮する場面があると考えられる。

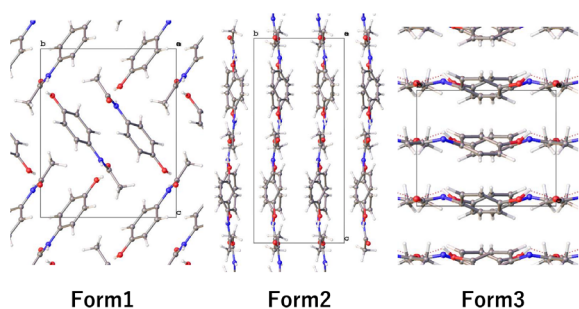


図4. 自動解析で決定されたアセトアミノフェンの各結晶多形の構造。各結晶多形の*a*軸投影方向からのパッキングを示す。試料中の多形の存在比率と構造情報の情報が同時に得られる。

### 3.4. 絶対構造の決定

L-ロイシンは苦みを呈するが、D-ロイシンは甘みを呈するように、光学活性を有する化合物は、それぞれの対掌体で有する機能が異なることがあるため、その絶対立体配置を決定することは重要である。X線結晶構造解析では、異常分散によってフリーデル則が破れる、すなわち $I(hkl) \neq I(-h-k-l)$ となることを利用して絶対構造を決定する。一方、3D ED/MicroEDでは、フリーデル則は、異常分散ではなく、多重散乱の影響で破れるが、これを利用して絶対構造の決定が可能であるとの報告がある<sup>(7)</sup>。著者らは、Synergy-EDで収集したデータを用いて、立体配置が既知の化合物であるL-チロシンを用いて、絶対構造の決定を試みた。測定および解析の流れは以下のとおりである。

1. Synergy-EDで通常の手順でデータ収集を行う。
2. CrysAlisPro for EDで通常と同様にデータ処理を行う。この際、通常出力されるファイルに加えて、

多重散乱を考慮した精密化を行うためのファイルが同時に作成される。

3. 2.で得られたファイルを用いて、構造解析はJana2020<sup>(8)</sup>を使用し、多重散乱を考慮した構造精密化を行う。

絶対構造判定には、同一のデータを用いて、上述の手順で多重散乱を考慮した構造精密化を行うが、L-チロシンとしてモデリングした場合とD-チロシンとしてモデリングした場合の2通りで精密化を行い、両者の $R_1$ 値、 $wR_2$ 値を比較した。正しい対掌体(ここではL-チロシン)の構造は、もう一方よりも $R_1$ 、 $wR_2$ 値が低くなるはずである。結果、図5に示した通り、L-チロシンの場合、L-チロシンとしてモデリングして精密化を行った場合のほうが、D-チロシンの場合よりも $R_1$ 、 $wR_2$ ともに値が低く、絶対構造の決定が可能であることが示された。

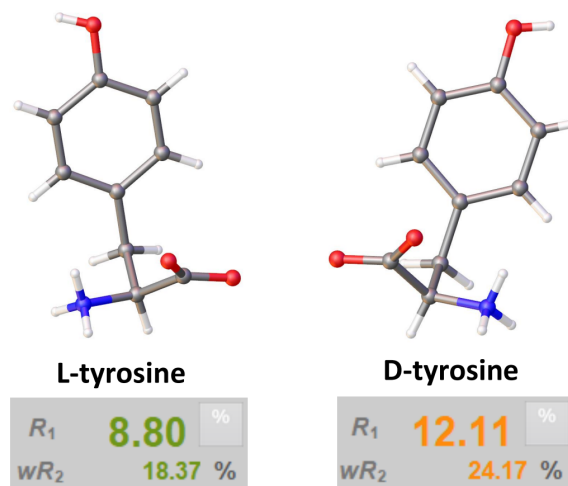


図5. 3D ED/MicroEDによるL-チロシンの絶対構造の決定。データ収集およびデータ処理はSynergy-ED、構造精密化はJana2020で行った。

3D ED/MicroEDで絶対構造の決定が可能であることが示されたことで、今後1  $\mu\text{m}$ 以下の微小結晶の絶対構造決定が多くなされると予想される。また、微小結晶の絶対構造決定だけでなく、化合物の構成元素が、炭素および水素などの軽元素のみからなる場合においても3D ED/MicroEDでの絶対構造決定が有用であろう。なぜならX線では、軽元素のみから構成される化合物結晶の場合、異常分散シグナルが小さくなり、絶対構造決定が困難になることがある。このような場合においても、前述の通り3D ED/MicroEDは、X線とは異なり、フリーデル則が破れる原因が多重散乱によるので、絶対構造決定が可能であると期待されるからである。検証として、炭素と水素のみからなる5 $\alpha$ -コレスタンの絶対構造を3D ED/MicroEDで試みた。この化合物の絶対構造はX線でも可能であったが、データ

の冗長性が平均約10以上必要で、測定には数時間を要した。これに対して3D ED/MicroEDを用いた場合の測定時間はおおよそ2分であった。多重散乱を考慮した精密化を行い、絶対構造の決定を試みたところ、X線と同一の対掌体の構造が正しい絶対構造として結論された。

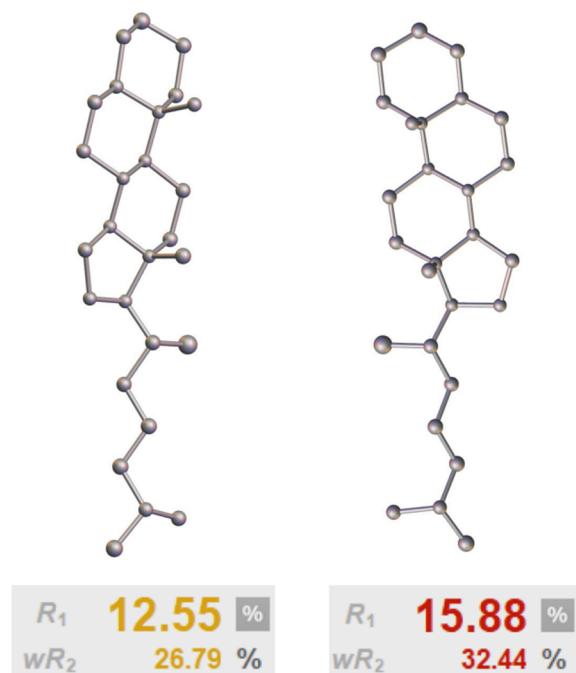


図6. 3D ED/MicroEDで決定した5 $\alpha$ -コレスタンの絶対構造。非水素原子のみを用いて構造精密化を行った。

単結晶X線構造解析による絶対構造の決定は非常に有用であるが、L-チロシンおよび5 $\alpha$ -コレスタンの例で示したように、3D ED/MicroEDによる絶対構造決定も可能である。今後の絶対構造決定は、化合物の種類に応じて、X線と3D ED/MicroEDの使い分けがされる、もしくは異なる手法を用いた検証として、両者による絶対構造決定が行われると考えられる。

#### 4. おわりに

Synergy-EDを用いた3D ED/MicroEDの結晶構造解析について、測定例および応用例を中心に紹介した。X線結晶構造解析の重要性は揺るぎないものであるが、今後は結晶サイズ、準備できる試料の量、および実験の目的に応じて、X線と3D ED/MicroEDを相補的に利用することがますます重要になるであろう。

#### 参考文献

- (1) R. Henderson: The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Q. Rev. Biophys.*, **28** (2) (1995), 171–193.
- (2) M. Gemmi, E. Mugnaioli, T.E. Gorelik, U. Kolb, L. Palatinus, P. Boullay, S. Hovmöller and J.P. Abrahams: 3D electron diffraction: The nanocrystallography revolution. *ACS Cent. Sci.*, **28** (8) (2019), 1315–1329.
- (3) R. F. Service: Molecular CT scan could speed drug discovery, *Science*, **26** (2018), 362.
- (4) Ito, S. et al.: Structure determination of small molecule compounds by an electron diffractometer for 3D ED/MicroED. *CrystEngComm*, **23** (2021), 8622–8630.
- (5) N. Pearce, K. E. A. Reynolds, S. Kayal, et al.: Selective photoinduced charge separation in perylene-diimide-pillar [5] arene rotaxanes. *Nat. Commun.*, **13** (2022), 415.
- (6) A. G. Shtukenberg, M. Tan, L. Vogt-Maranto, E. J. Chan, W. Xu, J. Yang, M. E. Tuckerman, C. T. Hu and B. Kahr: *Cryst. Growth Des.*, **19** (7) (2019), 4070–4080.
- (7) B. Petr, L. Palatinus and M. Babor: Electron diffraction determines molecular absolute configuration in a pharmaceutical nanocrystal. *Science*, **364** (2019), 6441, 667–669.
- (8) L. Palatinus, et al.: Specifics of the data processing of precession electron diffraction tomography data and their implementation in the program PETS2.0. *Acta Crystallogr. Sec. B: Struct. Sci., Cryst. Eng. Mater.*, **75** (4) (2019), 512–522.
- (9) P. Václav, D. Michal and P. Lukáš: Crystallographic Computing System JANA2006: General features *Zeitschrift für Kristallographie-Crystalline Materials*, **229** (5) (2014), 345–352.