

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/018744 A1

(51) 国際特許分類: C30B 29/58, B01D 9/02

府 大阪市 中央区本町橋2番5号 マイドームおおさか  
内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010681

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 25 日 (25.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-245700 2002 年 8 月 26 日 (26.08.2002) JP  
特願 2002-382617

2002 年 12 月 27 日 (27.12.2002) JP

特願2003-86561 2003 年 3 月 26 日 (26.03.2003) JP

特願2003-273685 2003 年 7 月 11 日 (11.07.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団  
法人大阪産業振興機構 (OSAKA INDUSTRIAL PRO-  
MOTION ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒540-0029 大阪

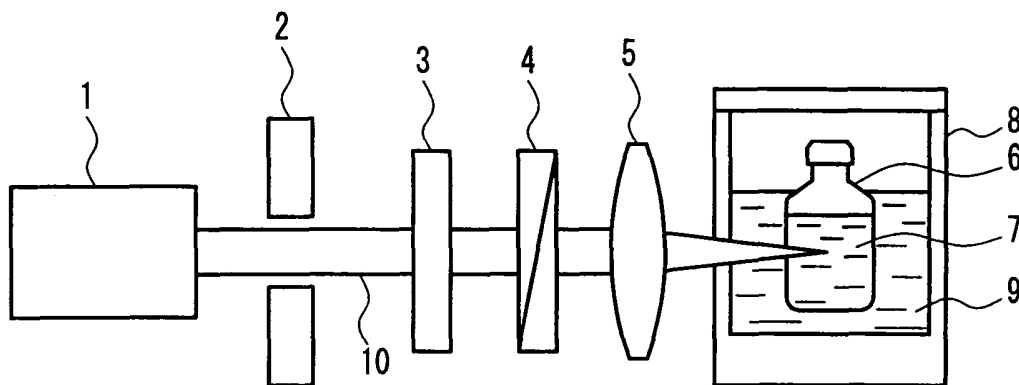
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐々木 孝友  
(SASAKI, Takatomo) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹田  
市 山田丘2-1 大阪大学大学院工学研究科内 Osaka  
(JP). 森 勇介 (MORI, Yusuke) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪  
府 吹田市 山田丘2-1 大阪大学大学院工学研究科内  
Osaka (JP). 吉村 政志 (YOSHIMURA, Masashi) [JP/JP];  
〒565-0871 大阪府 吹田市 山田丘2-1 大阪大学大学  
院工学研究科内 Osaka (JP). 安達 宏昭 (ADACHI, Hi-  
roaki) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹田市 山田丘2-1  
大阪大学大学院工学研究科内 Osaka (JP). 増原 宏  
(MASUHARA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹  
田市 山田丘2-1 大阪大学大学院工学研究科内 Osaka  
(JP). 細川 陽一郎 (HOSOKAWA, Youichiroh) [JP/JP]; 〒  
565-0871 大阪府 吹田市 山田丘2-1 大阪大学大学院  
工学研究科内 Osaka (JP). 高野 和文 (TAKANO, Kazu-  
fumi) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府 吹田市 山田丘2-1 大  
阪大学大学院工学研究科内 Osaka (JP).

[ 続葉有 ]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING CRYSTALLINE NUCLEUS AND METHOD OF SCREENING CRYSTALLIZATION  
CONDITIONS

(54) 発明の名称: 結晶核の製造方法および結晶化条件スクリーニング方法



(57) Abstract: A process for efficiently and conveniently producing crystals having excellent qualities of a protein or an organic substance. A solution of a protein or an organic substance is prepared and slowly cooled to attain supersaturation at a low degree. Next, this supersaturated solution is irradiated with femtosecond lasers 10. At the focus of the lasers, a topical explosion occurs and thus a crystalline nucleus is formed. Based on this crystalline nucleus, crystals are allowed to develop over a long period of time. Thus, crystals having excellent qualities can be obtained. As the femtosecond lasers, use can be made of titanium:sapphire lasers having a wavelength of 800 nm, a time-width of 120 fs, a frequency of 1 kHz and an output of 400 mW.

(57) 要約: 本発明は、タンパク質や有機物の結晶を、高品質で効率良く簡単に製造する方法に関する。タンパク質や有機物の溶液を調製し、これをゆっくりと冷却することによって低度の過飽和にする。この過飽和溶液に、フェムト秒レーザー 10 を照射する。レーザーの焦点では、局所的な爆発現象が起きて結晶核が生成する。この結晶核を基に、時間をかけて結晶を成長させれば、高品質の結晶が得られる。フェムト秒レーザーとしては、波長 800 nm、時間幅 120 fs、周波数 1 kHz、出力 400 mW のチタンサファイアレーザーが使用できる。



WO 2004/018744 A1



(74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒530-6026 大阪府 大阪市 北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 結晶核の製造方法および結晶化条件スクリーニング方法

## 技術分野

本発明は、結晶核の製造方法および結晶化条件のスクリーニング方法  
5 に関する。

## 背景技術

ポストゲノム研究の進展により、タンパク質の構造解析が急務になってきているが、そのためには、タンパク質を結晶化する必要がある。また、有機結晶は、次世代デバイス材料として有望視されており、その高品質結晶製造技術のニーズが高い。一般に、溶液から結晶を析出させるためには、溶媒蒸発や温度変化などにより過飽和度を大きくする必要がある。しかし、有機物やタンパク質等のように分子量が大きい物質は、過飽和度を極めて大きくしないと結晶化しない。また、このような極めて大きな過飽和度の溶液では、一度結晶化が起こると、結晶が急成長するため、得られる結晶の品質に問題があるおそれがある。また、このような高分子量物質の結晶化は、一般に困難であり、生産性が悪かった。通常、結晶化の条件は、実際に結晶化を試みて、試行錯誤の結果、決定されるが、これでは、タンパク質や有機物等のように、結晶化が必要不可欠な物質では、煩雑すぎて、実用的ではない。また、ナノ秒のNd : YAGレーザーを用いて有機結晶を作成する試みがある（Physical Review Letters 77 (1996) p3475、特開2002-068899）。しかしながら、この方法では、結晶化は十分でなく、特にタンパク質の結晶化は困難である。

## 発明の開示

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、高品質の結晶を簡単に効率よく製造できる技術を提供することを第1の目的とし、結晶化条件を簡単に決定できる技術を提供することを第2の目的とする。

5

前記第1の目的を達成するために、本発明の結晶核の製造方法は、結晶化対象の溶質が溶解している溶液に対し、ピコ秒パルスレーザーおよびフェムト秒パルスレーザーの少なくとも一方のパルスレーザーを照射することにより結晶核を生成させる方法である。

10

このように、前記パルスレーザーを照射すれば、低過飽和溶液であっても結晶核が生成するので、これを基に、結晶をゆっくり成長させることができ、その結果、高品質の結晶が簡単に効率良く製造できる。本発明の方法は、タンパク質の結晶化および有機物の結晶化に最適であるが、その他の物質の結晶化にも使用できる。

15

また、前記第2の目的を達成するために、本発明の結晶化条件のスクリーニング方法は、結晶化対象の溶質が溶解している溶液に対し、ピコ秒パルスレーザーおよびフェムト秒パルスレーザーの少なくとも一方の  
20 パルスレーザーを照射する工程と、前記レーザー照射により結晶核が生成するか否かを判定する工程および前記レーザー照射により溶質が変化しているか否かを判定する工程の少なくとも一方とを含む方法である。

20

このように、前記パルスレーザーを照射して結晶核の生成を観察し、  
25 結晶核が生成すれば、その溶液等の条件は、結晶化に適していると判断できる。また、前記パルスレーザーを照射して溶質の状態を観察し、溶

質が変化していれば、その溶液等の条件は結晶化に適していると判断できる。前記溶質の変化は、タンパク質の場合、例えば、立体構造の変化（変性）である。

- 5 過飽和溶液に、ピコ秒パルスレーザーおよびフェムト秒パルスレーザーの少なくとも一方のパルスレーザーを照射すれば、結晶核が生成するが、そのメカニズムは不明である。これについて、本発明者等は、以下のように推測している。すなわち、前記パルスレーザーの焦点では、高密度の光子が集中するために、一つの溶質分子もしくは溶媒分子に光子
- 10 が数個衝突し、それらが光を吸収する現象（多光子吸収）が高い確率で起こる。その結果として、パルスレーザーを集光した時、その焦点で急激な光吸収による爆発現象（レーザーアブレーション）が誘起される。結晶核生成は、これが擾動となり起こると考えられる。そして、その後のメカニズムとしては、下記の3つが考えられる。
- 15
- (1) パルスレーザーにより光熱変換が引き起こされ焦点付近の溶液が瞬間的に蒸発し、溶質の濃縮が起こった結果として結晶核が生成する。
- (2) パルスレーザーが誘起するアブレーションにより衝撃波が発生し、それにより溶液が局所的に揺らされた結果として結晶核が生成する。
- 20 (3) レーザーの強度が強くなると溶液中で誘導散乱が引き起こされ、溶液中に濃度勾配が生成し、結晶核が生成する。

このように、本発明によれば、結晶化が困難なタンパク質や有機物であって、容易に効率良く結晶核を生成でき、これをゆっくり成長させれば高品質の結晶が得られる。また、本発明によれば、結晶化条件をスクリーニングでき、結晶化条件を迅速に決定できる。

25

### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の一実施例に使用したレーザー照射装置の構成図である。

図 2 は、レーザー照射による衝撃波の大きさを測定する装置の一例を示す構成図である。

図 3 は、パルスレーザーの衝撃波と粒子の動きとの関係の一例を示す模式図である。

図 4 は、前記装置で測定した衝撃波による粒子の移動距離とレーザー集光点との関係を示すグラフである。

10 図 5 は、前記装置で測定した衝撃波の強度とレーザー強度との関係を示すグラフである。

図 6 は、本発明のその他の実施例に使用したレーザー照射装置の構成図である。

図 7 は、本発明のさらにその他の実施例に使用したレーザー照射装置  
15 の構成図である。

図 8 は、本発明の一実施例で生じたタンパク質結晶の写真である。

図 9 は、本発明のその他の実施例で生じたタンパク質結晶の写真である。

図 10 は、本発明のさらにその他の実施例で生じたタンパク質結晶の  
20 写真である。

図 11 は、本発明のさらにその他の実施例で生じたタンパク質結晶の写真である。

図 12 は、本発明のさらにその他の実施例で生じたタンパク質結晶の写真である。

25 図 13 は、本発明のさらにその他の実施例で生じたタンパク質結晶の写真である。

図 1 4 は、参考例 2 に使用した攪拌装置の概略図である。

図 1 5 A と図 1 5 B は、従来法で得られた結晶を示す写真であり、図 1 5 C と図 1 5 D は、前記参考例 2 で得られた結晶を示す写真である。

図 1 6 は、本発明の容器の一例を示す断面図である。

5 図 1 7 は、本発明のプレートの一例を示す斜視図である。

図 1 8 は、本発明の容器のその他の例を示す図であり、A は平面図、B は断面図である。

図 1 9 は、本発明の容器のさらにその他の例を示す図であり、A は平面図、B は断面図である。

10 図 2 0 は、本発明の容器のさらにその他の例を示す断面図である。

発明を実施するための最良の形態

つぎに、本発明をさらに詳しく説明する。

15 前述のように、本発明では、ピコ秒パルスレーザーおよびフェムト秒パルスレーザーの少なくとも一方のパルスレーザーをレンズで溶液中に集光し、その集光位置で単発若しくは複数発の局所的な爆発現象を生じさせ、これによって結晶核を生成することが好ましく、また前記爆発現象により、溶質を変化させることも好ましい。

20

本発明において、パルスレーザーの光密度（光子流量：photon flux）は、例えば、 $5 \times 10^5$  (watt) 以上であり、好ましくは  $2 \times 10^9$  (watt) 以上である。パルスレーザーの光密度の上限は、特に制限されないが、例えば、 $10^{18}$  (watt) 以下であり、好ましくは  $10^{15}$  (watt)  
25 ) 以下であり、より好ましくは  $10^{12}$  (watt) 以下である。

後述するように、レーザー光強度（W）および時間幅（ $\Delta t$ ）の積が、光密度（I）であるから、レーザーの条件は、時間幅によって、例えば、以下のように設定することができる。なお、パルスレーザーは、ピコ秒パルスレーザーおよびフェムト秒パルスレーザーがあり、このなか  
5 で、フェムト秒レーザーが特に好ましい。

（ピコ秒パルスレーザー）

|                                                       | パルス時間幅<br>(秒)            | レーザー光強度 A<br>(J/pulse)                       | レーザー光強度 B<br>(J/pulse)                   |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------|
| 10 一般的範囲                                              | $10^{-9} \sim 10^{-12}$  | $0.5 \times 10^{-3} \sim 0.5 \times 10^{-6}$ | $2 \sim 2 \times 10^{-3}$                |
| 好的範囲                                                  | $10^{-11} \sim 10^{-12}$ | $0.5 \times 10^{-5} \sim 0.5 \times 10^{-6}$ | $2 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-3}$ |
| レーザー光強度 A : 光密度 (I) = $5 \times 10^5$ (w a t t) 以上の場合 |                          |                                              |                                          |
| レーザー光強度 B : 光密度 (I) = $2 \times 10^9$ (w a t t) 以上の場合 |                          |                                              |                                          |

15 （フェムト秒パルスレーザー）

|                                                          | パルス時間幅<br>(秒)            | レーザー光強度 A<br>(J/pulse)                       | レーザー光強度 B<br>(J/pulse)                   |
|----------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------|
| 一般的範囲                                                    | $10^{-12} \sim 10^{-15}$ | $0.5 \times 10^{-6} \sim 0.5 \times 10^{-9}$ | $2 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-6}$ |
| 好的範囲                                                     | $10^{-13} \sim 10^{-15}$ | $0.5 \times 10^{-7} \sim 0.5 \times 10^{-9}$ | $2 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-6}$ |
| 20 レーザー光強度 A : 光密度 (I) = $5 \times 10^5$ (w a t t) 以上の場合 |                          |                                              |                                          |
| レーザー光強度 B : 光密度 (I) = $2 \times 10^9$ (w a t t) 以上の場合    |                          |                                              |                                          |

パルスレーザーは、単発で照射してもよいし、複数発繰り返して照射  
25 してもよい。パルスレーザーの照射回数は、特に制限されないが、例えば、1 発（単発）から 1 0 0 0 万発の範囲である。また、繰り返し複数

発照射する場合のレーザー繰り返し周波数は、例えば、 $1/100000000\text{ Hz} \sim 1\text{ kHz}$ の範囲である。照射時間も特に制限されず、例えば、1秒から1時間の範囲である。

- 5      パルスレーザーの具体例としては、例えば、フェムト秒チタンサファイアレーザー、フェムト秒ファイバーレーザー、ナノ秒・ピコ秒Nd<sup>3+</sup>:YAGレーザー、ナノ秒・ピコ秒Nd<sup>3+</sup>:VVO<sub>4</sub>レーザー、エキシマレーザーおよびアレクサンドライトレーザー等がある。
- 10      本発明において、結晶化対象の溶質が溶解している溶液は、過飽和溶液であることが好ましく、より好ましくは低過飽和溶液である。タンパク質溶液の濃度は、例えば、200～500%であり、好ましくは100～300%であり、より好ましくは50～200%である。有機物溶液の濃度は、例えば、20～50%であり、好ましくは10～30%で
- 15      あり、より好ましくは5～20%である。また、本発明の対象となるタンパク質としては、例えば、リゾチーム、グルコースイソメラーゼ、キシナラーゼ、ミオグロビン、カタラーゼ、トリプシン、ヒトリゾチーム、フォトアクティブイエロープロテイン、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、リボヌクレアーゼ、プロスタグランジンF<sub>2</sub>α合成酵
- 20      素、アデノシンデアミナーゼ、主要異物排出トランスポーター等がある。有機物としては、例えば、4-dimethylamino-N-methyl-4'-N-stilbazolium tosylate (DAST)、メチルニトロアニリン(MNA)、リン酸エルアルギニン(LAP)等がある。なお、後述の実施例に示すように、本発明の方法によれば、従来、結晶化が困難であった膜タンパク質が、結晶化できる。

25

つぎに、本発明の方法を実施するための装置の一例を図1に示す。図

- 示のように、この装置は、フェトム秒レーザー照射手段 1、機械シャッター 2、半波長板 3、偏光子 4、集光レンズ 5、恒温水槽 8 を有する。恒温水槽 8 の中には、水 9 が入っており、その中に、結晶化対象の溶質が溶解した溶液 7 が入った試料容器 6 が配置される。恒温水槽 8 では、
- 5 温度を徐々に低下させることで、溶液 7 の溶解度を低下させて過飽和状態にする。この時、過度の過飽和にすると結晶成長が速くなるので、低度の過飽和にする。そして、レーザー照射手段 1 よりレーザー光 10 を照射すると、レーザー光 10 は、機械シャッター 2、半波長板 3、偏光子 4 および集光レンズ 5 を通過し、溶液 7 内で集光し、ここで急激な光
- 10 吸収による爆発現象がおき、これが結晶核生成を誘引する。結晶を成長させる場合は、この結晶核を基に、時間をかけてゆっくりと成長させれば、高品質の単結晶が得られる。また、結晶化条件をスクリーニングする場合、溶液の濃度、溶質の構成比率、温度条件を少しずつ変えた溶液を複数準備し、それらにレーザー光を照射後、溶液を観察する。そして
- 15 、結晶核の生成や溶質の変化が確認できた場合、その溶液は結晶化条件に適していると判断し、そうでない場合は、結晶化条件不適と判断する。本発明のスクリーニング方法は、結晶化条件決定の一次スクリーニングとして使用することが好ましい。
- 20 本発明において、結晶化対象の溶質を溶解させた溶液は、それを入れた容器を運動させることにより前記溶液を攪拌しながら前記結晶を発生させ、これを成長させることが好ましい。

- このように、溶液自身を直接攪拌するのではなく、それが入った容器
- 25 を回転、振動、揺動等の運動をさせることにより、間接的に、前記溶液を攪拌すれば、簡単に穏やかな攪拌を実現でき、また、前記溶液の対流

を自在に制御できるため結晶生成に適した攪拌を選択できる。この結果、従来は結晶化が難しかったタンパク質のような高分子であっても、結晶化が可能となる。

- 5 前記運動は、特に制限されず、回転、振動および揺動等があり、これらを2種類以上組み合わせた運動であってもよい。前記運動の程度も特に制限されず、高分子溶液の種類等に応じて適宜決定される。円運動の場合、例えば、10～1000 r p m、好ましくは30～200 r p m、より好ましくは50～100 r p mである。

10

前記容器は、特に制限されず、例えば、ビーカ、シャーレ、複数のウェルを有するウェルプレート等が使用できる。

- 15 結晶の発生・成長は、例えば、前記溶液を過飽和状態にすることにより、実施できる。過飽和状態は、例えば、前記溶液中の溶媒を蒸発させればよい。蒸発は、特に制限されず、自然蒸発、加熱による蒸発、減圧乾燥による蒸発、凍結乾燥による凍結等がある。この他に、前記溶質以外の成分が前記溶液より高濃度で溶解したりザーバー溶液を入れた別の容器を準備し、この容器と前記結晶化対象の溶液を入れた容器とにおいて、水蒸気が移動可能な状態にすると、前記結晶化対象の溶液の蒸発が  
20 穏やかな条件で促進でき、特に、変性しやすいタンパク質等の生体高分子にとっては、好ましい。このような方法を、通常、蒸気拡散法という。

- 25 本発明において、結晶の成長の場合は特に制限されない。通常、成長した結晶は、溶液より比重が重いため沈降し、容器底に移動する。このような方法を、通常、Sitting drop 法という。しかし、容器底で結晶が成

長すると、ここに貼りついて回収に支障をきたす場合もある。そこで、前記容器に、前記結晶化対象の溶液よりも比重が重い液を入れ、前記比重が重い液と前記溶液との界面で結晶を成長させることが好ましい。このような方法は、通常、Floating-drop 法という。

5

容器を運動させて溶液を攪拌する方法において、結晶化対象の物質は特に制限されず、例えば、樹脂、タンパク質、糖類、脂質および核酸等がある。この方法は、結晶化が特に困難なタンパク質等の生体高分子に適用することが好ましい。タンパク質としては、例えば、ニワトリ卵白

10 リゾチーム、ヒトリゾチーム、グルコースイソメラーゼ、キシナラーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、リボヌクレアーゼ、プロスタグランジン F<sub>2</sub>  $\alpha$  合成酵素、アデノシンデアミナーゼ、主要異物排出トランスポーターなどが挙げられる。

- 15 つぎに、本発明の容器は、本発明の製造方法若しくはスクリーニングに使用する容器である。本発明の容器は、つぎの3つの種類の容器である。

- 本発明の第1の容器は、本発明の結晶核若しくは結晶の製造方法に使用
- 20 用する容器若しくは本発明の結晶条件のスクリーニングに使用する容器であって、結晶化対象物質の溶液を入れる第1の部屋と、前記結晶化対象物質の溶液における結晶化対象物質以外の成分のみが前記結晶化対象物質の溶液より高濃度で溶解しているリザーバー溶液を入れる第2の部屋と、前記第1の部屋および前記第2の部屋と連通し、気体が通過可能な通路とを有し、前記第1の部屋の一部若しくは全部が、前記結晶化対象物質の溶液にレーザー光線を照射可能なように透明若しくは半透明で
- 25

ある容器である。

この容器は、いわゆる蒸気拡散法により結晶化対象物質の溶液の溶媒の蒸発を促進し、結晶化対象物質の結晶の生成を促進するものであるが、  
5 結晶化対象物質の溶液が入っている第1の部屋にレーザー光を照射することにより、強制的に結晶核を生成させたり、結晶化条件をスクリーニングしたりするものである。

また、前記第1の容器を1つのプレート内に複数形成してもよい。

10

本発明の第2の容器は、本発明の結晶核若しくは結晶の製造方法に使用する容器若しくは本発明の結晶条件のスクリーニングに使用する容器であって、結晶化対象物質の溶液を入れる第1の部屋と、結晶化対象物質の溶液における結晶化対象物質以外の成分のみが前記結晶化対象物質  
15 の溶液より高濃度で溶解しているリザーバー溶液を入れる第2の部屋と、前記第1の部屋および前記第2の部屋と連通し、気体が通過可能な通路とを有し、前記第1の部屋が複数あり、これが複数の前記通路により一つ以上の前記第2の部屋と連通しており、前記複数の通路において、それぞれ、通路径若しくは通路長の少なくとも一つが異なる容器であり、  
20 前記第1の部屋の一部若しくは全部は、前記結晶化対象物質の溶液にレーザー光線を照射可能なように透明若しくは半透明である容器である。

この容器は、いわゆる蒸気拡散法により結晶化対象物質の溶液の溶媒の蒸発を促進し、結晶化対象物質の結晶の生成を促進するものであるが、  
25 前記複数の通路において、通路径および通路長のいずれか若しくは双方がそれぞれ異なるため、複数の蒸気拡散条件を同時に設定することがで

き、結晶化の最適条件をスクリーニングしたり、その条件で結晶を生成させるものである。

前記第 2 の容器を、1 つのプレート内に複数形成してもよい。

5

本発明の第 3 の容器は、本発明の結晶核若しくは結晶の製造方法に使用する容器若しくは本発明の結晶条件のスクリーニングに使用する容器であって、結晶化対象物質の溶液および前記結晶化対象物質の溶液より比重が重たくかつ前記結晶化対象物質の溶液と混合しない非混合性高比重液を入れる第 1 の部屋と、結晶化対象物質の溶液における結晶化対象物質以外の成分のみが前記高分子溶液より高濃度で溶解しているリザーバー溶液を入れる第 2 の部屋とを有し、前記第 2 の部屋の中に前記第 1 の部屋が形成され、前記第 1 の部屋において、下部の大容積部と、これより容積が小さい上部の小容積部とを有し、その上部先端は開口して前記両部屋の間は気体が通過可能であり、少なくとも前記第 1 の部屋の上部もしくは先端開口部に結晶化対象物質の溶液を保持し、かつ前記結晶化対象物質の溶液にレーザーを照射可能なように容器の一部若しくは全部が透明若しくは半透明である容器である。

20 この容器は、いわゆる蒸気拡散法により結晶化対象物質の溶液の溶媒の蒸発を促進し、かつ結晶化対象物質の溶液と非混合性高比重液との界面で結晶化対象物質の結晶の生成を促進するものであるが、前記第 1 の部屋の前記小容積部もしくは先端開口部に結晶化対象物質の溶液を保持するため、結晶化対象物質の溶液は少量であってもよい。また、前記第 25 1 の部屋の前記大容積部に位置する非混合性高比重液を、例えば、マグネットスターラー等で攪拌すれば、間接的に結晶化対象物質の溶液を攪

拌することができ、さらに結晶化を促進させることが可能である。

前記第 3 の容器の前記第 1 の部屋において、前記下部の大容積部の形状が逆円錐台若しくは逆角錐状台であり、前記上部の小容積部の形状が  
5 円筒若しくは角筒であり、前記両者が連結していることが好ましい。このような形状であれば、前記第 1 の部屋において、前記上部の小容積部の先端開口の上に結晶化対象物質の溶液の液滴を形成し、この状態で、前記結晶化対象物質の溶液の溶媒を蒸発させることが可能である。また、前記第 3 の容器を 1 つのプレート内に複数形成してもよい。

10

本発明において、前記結晶化対象物質は、特に制限されず、例えば、樹脂、タンパク質、糖類、脂質および核酸等があり、このなかで、タンパク質の結晶化について本発明の容器を適用することが好ましい。タンパク質としては、例えば、ニワトリ卵白リゾチーム、ヒトリゾチーム、  
15 グルコースイソメラーゼ、キシナラーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、リボヌクレアーゼ、プロスタグランジン F<sub>2</sub>  $\alpha$  合成酵素、アデノシンデアミナーゼ、主要異物排出トランスポーターなどが挙げられる。

## 20 実施例

つぎに、本発明の実施例について比較例と併せて説明する。

### (装置)

図 1 に示す装置を実施例 1、2、比較例 1 および参考例に用いた。この装置は、高出力フェムト秒チタンサファイアレーザー 10 を焦点距離  
25 170 mm のレンズ 5 により集光し、恒温水槽 8 中の試料溶液 7 に照射する

装置である。恒温水槽 8 は、温度を  $\pm 0.05^{\circ}\text{C}$  の精度で制御できる。  
レーザー 10 の波長は 800nm、時間幅は 120fs である。レーザー発振の繰  
り返し周波数は 1 kHz から 1 Hz まで調整できる。試料溶液 7 に単発のレー  
ザパルスを照射するときは、繰返し周波数を 20 Hz に調節し、そのパ  
ルス列から機械シャッター 2 を 50 ms だけ開くことにより単発パルスを  
抜き出す。レーザー光強度は、半波長 3 と偏光子 4 により調整できる。  
この装置では、試料溶液 7 に対して強度  $250 \mu\text{J/pulse}$  ( $2 \times 10^9 \text{ watt}$ ) のレーザーパルスを照射することができる。

#### 10 (実施例 1)

DAST(4-dimethylamino-N-methyl-4'-N-stilbazolium tosylate) 3.5g を  
、メタノール 200ml および回転子と共に、容量 200ml のテフロン容器 6 に  
入れ、初期温度  $27.0^{\circ}\text{C}$  の恒温水槽 8 内にて 2 時間で  $55.0^{\circ}\text{C}$  まで上昇させ、  
スターラ攪拌しながら溶解させた。約 5 時間後に DAST が溶解しているのを  
確認して溶液 7 を 3 つに分け、育成溶液とした。この際、回転子は取り除  
いた。溶液準備 16 時間後に、 $55^{\circ}\text{C}$  で 10 時間加熱後、毎時間  $3^{\circ}\text{C}$  ずつ下げて  
 $23^{\circ}\text{C}$  まで温度を降下させた。さらに、毎時間  $0.1^{\circ}\text{C}$  で下げ  $21.4^{\circ}\text{C}$  まで温度  
を降下させた。この状態で、フェムト秒レーザーを光強度  $250 \mu\text{J/pulse}$   
( $2 \times 10^9 \text{ watt}$ )、繰返し周波数 1kHz で 2 分間照射した。その後  
、1 時間は結晶析出のないことを確認し、その 10 時間後に肉眼で結晶が析  
出していることを確認した。前記温度を保持したまま、約 6 日観察を続け  
たところ、最初に発見した結晶は成長し、更に 2、3 個の結晶を確認した。  
再び強度  $250 \mu\text{J/pulse}$  ( $2 \times 10^9 \text{ watt}$ )、繰返し周波数 1kHz  
で 1 分間レーザーを照射し、その後 3 日間は結晶析出のないことを確認し  
た。

## (実施例 2)

結晶核生成対象として、ニワトリ卵白リゾチームを使用した。その溶液は、蒸留水50mlに酢酸ナトリウム三水和物0.467gを加え、これに酢酸を加えてpH4.5に調整した後、塩化ナトリウム1.25gおよびニワトリ卵白  
5 リゾチーム1.25gを加えて調製した。室温に調整した前記試料溶液7を、100mlのテフロン容器6に入れ、恒温水槽8にて40℃で24時間保持し、完全に溶解させた。その後、25℃まで5時間で冷却し、メンブランフィルタにて不純物を除去した。その溶液2mlとフロリナート3mlを、10本の直径18mmのネジ蓋付きガラス瓶6にそれぞれ注入した。これらのガラス瓶  
10 6を25℃に保持した恒温水槽8内に静置させ、溶液温度を15℃まで20時間で降下させた。この試料溶液（リゾチーム溶液）7の飽和点は23.8℃である。そして、結晶の析出がないことを確認して14℃まで24時間で降下させ、14℃で24時間保持し、再度、結晶の析出がないことを確認した。そして、光強度 $250 \mu\text{J/pulse}$  ( $2 \times 10^9 \text{ watt}$ ) のフェムト秒パ  
15 ルスレーザーを溶液7内に1分間、順次照射して、変化を観察した。照射条件は、レーザーの繰り返し周波数を変化させ、50Hz、100Hzで、それぞれ前記ガラス瓶2本ずつ照射し、コントロールとして4本の前記ガラス瓶にはレーザーを照射しなかった。レーザー照射1日後に、50Hz、100Hzの溶液中に結晶が析出していることを肉眼で確認した。レーザーを照射し  
20 ていない溶液では結晶の析出は見られなかった。また、結晶の析出が見られなかった溶液に500Hz、1000Hzのレーザーをそれぞれ照射したところ、溶液内に、リゾチームが凝集（変性）しているのが観察され、この溶液は結晶化の可能性ありと判定した。

## 25 (比較例 1)

実施例2と同じ条件のタンパク質溶液を用いて、YAGレーザー（波

長1064nm、5 ns) を照射して結晶核の生成を試みた。前記タンパク質溶液は、蒸留水50mlに酢酸ナトリウム三水和物0.467gを加え、これに酢酸を加えてpH4.5に調整した後、塩化ナトリウム1.25gおよびニワトリ卵白リゾチーム1.25gを加えて調製した。室温に調整した前記試料溶液7を、100mlのテフロン容器に入れ、恒温水槽にて40℃で24時間保持し、完全に溶解させた。その後、25℃まで5時間で冷却し、メンブランフィルタにて不純物を除去した。その溶液2mlとフロリナート3mlを、10本の直径18mmのネジ蓋付きガラス瓶にそれぞれ注入した。これらのガラス瓶を25℃に保持した恒温水槽内に静置させ、溶液温度を15℃まで20時間で降下させた。この試料溶液（リゾチーム溶液）の飽和点は23.8℃である。そして、結晶の析出がないことを確認して14℃まで24時間で降下させ、14℃で24時間保持し、再度、結晶の析出がないことを確認した。そして、YAGレーザーを溶液内に1分間、順次照射して、変化を観察した。照射条件は、レーザーの繰り返し周波数を変化させ、10Hz、20Hz、50Hz、100Hz、500Hz、1000Hzをそれぞれ照射し、コントロールとして4本のガラス瓶にはレーザーを照射しなかった。レーザー強度は1.2mJ/pulseであった。レーザー照射1日後、結晶の析出は確認できず、さらに過飽和度を大きくするため16℃まで10時間で降下させ、12時間保持し、結晶の析出がないことを確認して、再度レーザーを照射した。照射条件は上記と同じである。この時も結晶の析出は確認できず、同様に、15℃、14℃でもレーザー照射したが、結局、結晶の析出および変性を確認できなかった。この例での光強度は、実施例で用いたフェムト秒パルスレーザーよりも10倍大きい、光密度（光子流量）は $2.5 \times 10^5$  (watt) であり、実施例の一万分の一であり、これが原因で結晶核が生成しなかったと推察できる。

## (参考例 1)

図 2 に示す装置を用いてパルスレーザーの爆発現象により生じるであろう衝撃波を調べた。この装置は、パルスレーザー照射装置を正立顕微鏡に組み込んだものである。図示のように、正立顕微鏡 1 1 は、観察対象物を置くステージ 2 8 と、コンデンサーレンズ 2 9 と対物レンズ（100 倍、開口数 1.25）2 6 を備え、前記ステージ 2 8 の上には、マイクロチップ 2 7 が配置されている。また、正立顕微鏡 1 1 下部のコンデンサーレンズ 2 9 下には、光源ランプ 1 3 が配置され、この光を検出する CCD カメラ 1 2 が顕微鏡 1 1 上部に配置されている。また、正立顕微鏡 1 1 外部にパルスレーザー照射装置 2 1 が配置されており、レーザー 2 2 は、1/2 波長板 2 3 および偏光子 2 4 を通って正立顕微鏡 1 1 内に照射され、ダイクロイックミラー 2 5 によって光路が直角に曲げられてステージ 2 8 上のマイクロチップ 2 7 内に照射されるようになっている。前記パルスレーザーとしては、チャープ増幅による高出力フェムト秒チタンサファイアレーザー (800 nm, 120 fs) を使用している。また、マイクロチップ 2 7 内には、ポリスチレン微粒子（直径 1  $\mu$ m）の分散液が入っている。この装置において、レーザー 2 2 を照射すると、ステージ 2 8 上に配置されたマイクロチップ 2 7 内のポリスチレン微粒子分散液にレーザー 2 2 が集光する。そして、マイクロチップ 2 7 内の様子は、CCD カメラ 1 2 で観察する。

つぎに、この装置を使い、ポリスチレン微粒子に対する衝撃波の影響を調べた。すなわち、前述の条件により、ポリスチレン微粒子分散液内に単発でフェムト秒チタンサファイアレーザーを照射した。レーザーの集光点で発生すると予想される衝撃波は 3 次元的に拡散し、微粒子はレーザー集光点から遠ざかる方向へ押される。この衝撃波によるポリスチ

レン微粒子の動きをＣＣＤカメラで観察し、レーザーの集光点から離れる距離を調べることにより、衝撃波の大きさを見積もった。図３は、パルスレーザー照射による衝撃波がポリスチレン微粒子に与える力の関係を模式的に表したものである。同図において、 $f$  は微粒子が受ける衝撃波の力（５）を示し、 $F_0$  は衝撃波により発生する力（１）を示し、 $R_0$  は微粒子の初期位置を示し、 $R$  は衝撃波中心からの微粒子の位置を示し、 $r$  は微粒子の半径を示し、３２はレーザー光を示し、３３はポリスチレン微粒子を示し、３４はレーザーの集光点を示し、３７はポリスチレン微粒子分散液を示す。また、図４は、パルスレーザー照射と、その衝撃波による微粒子の移動距離の（１０）関係を示すグラフである。同図において、横軸は、時間（１）を示し、縦軸は、衝撃波中心からの微粒子の位置（ $R$ ）を示し、 $R_0$  は微粒子の初期位置を示し、 $L$  は微粒子の移動距離を示し、黒丸はパルスレーザーの照射時間（１）を示す。このグラフに示すように、パルスレーザーが照射されると、微粒子が瞬間的に焦点から遠ざかることが解る。衝撃波がインパルス応答で３次元的に等方的に伝搬して、微粒子が水の粘性抵抗により停止すると仮定した場合、以下の式が成立し、微粒子の初期位置（ $R_0$ ）と移動距離（ $L$ ）の関係から衝撃波により発生する力（ $F_0$ ）を見積もることができる。

20 微粒子の受ける衝撃波の力：

$$f = F_0 \frac{\pi r^2}{4\pi R_0^2} \delta(t)$$

微粒子の運動方程式：

$$m \frac{d^2 R}{dt^2} = -6\pi\eta r \frac{dR}{dt} + f$$

微粒子の変位量：

$$L = R(t = \infty) - R_0$$

$$\Leftrightarrow L = \frac{F_0 \cdot r}{24p\eta} \cdot \frac{1}{R_0^2}$$

このようにして、数百にのぼる微粒子の動きを観測し、フェムト秒チ  
タンサファイアレーザーの光強度と衝撃波により発生する力の関係を求  
5 めた。その結果を、図5のグラフに示す。このグラフにおいて、縦軸は  
衝撃波の力（ $F_0$ ）を示し、横軸はレーザー光強度（ $I_0$ ）を示す。図示  
のように、この参考例では、60 nJ/pulse 以上で衝撃波を確認できた。  
爆発現象の閾値は、多光子吸収の確率に依存するため、レーザーエネル  
ギーの総量として定義されるレーザー強度ではなく、瞬間的に到達する  
10 光の密度（ $I$ ）により関係づけられる。この参考例では、時間幅（ $\Delta t$ ）  
120 fs のパルスレーザーのレーザー強度（ $W$ ）が60 nJ/pulse であ  
ったから、その光密度（ $I$ ）は、以下ようになる。

$$I = W / \Delta t = 5 \times 10^5 \text{ (J/s} \cdot \text{pulse} = \text{watt)}$$

15

したがって、この参考例では、時間幅（ $\Delta t$ ）は、 $\Delta t < W / 5 \times 10^5$  となる。この式とレーザー照射装置の能力とを考慮すると、ナノ秒以下の時間幅を持つパルスレーザーが好ましく、より好ましくはピコ秒以下、最適にはフェムト秒以下である。なお、この参考例によって、本  
20 発明は限定的に解釈されない。また、この参考例では、レーザー集光点で爆発現象が起きて衝撃波が発生すると仮定しているが、本発明は、これに限定されない。

なお、この参考例では衝撃波の可視化のためにポリスチレン微粒子を

用いているが、ポリスチレン微粒子の重量は $1.1 \times 10^{-12} \text{g}$ であり、蛋白質の1億倍以上の重量である。つまり、蛋白質はポリスチレン微粒子よりも遙かに弱い衝撃波でも、その密度を変化させる可能性がある。ポリスチレン微粒子の可視化により定義されたパルスレーザーの光密度とレーザー強度は、本発明におけるその下限を限定するものではない。

### (実施例3)

本実施例はニワトリ卵白リゾチーム（14 kDa）を結晶化した実施例である。タンパク質溶液の条件は、25 mg/mlのリゾチーム、2.5%の塩化ナトリウム、0.1 Mの酢酸ナトリウム、pH 4.5であり、室温で調製した。この溶液を、メンブランフィルタにて不純物を除去した。

結晶化は、図6に示すレーザー照射装置および結晶化プレートを用い、バッチ法にて行った。図示のように、このレーザー照射装置では、フェムト秒レーザー照射装置101から照射されたレーザーが、ミラー102、波長板103、偏光子104およびシャッター105を通過して対物レンズ（10倍）108で集光され、結晶化プレート109の結晶育成容器部107に照射されるようになっている。前記結晶化プレート109は、蒸気拡散法を利用したものであり、タンパク質溶液を入れる結晶育成容器部107と、これと連通しているサーバー溶液部106とを有する。前記サーバー溶液は、タンパク質溶液において、タンパク質を除いた残りの成分と同じ成分が溶解している溶液であり、これによってタンパク質溶液の蒸発が促進される。同図において、110はシーリングテープであり、111は透明ガラスである。そして、前記結晶育成容器部107は、接眼レンズ112で肉眼で観察できるようになってお

り、またCCD113カメラおよびモニター114によっても観察可能となっている。

レーザーの照射は、温度・湿度管理したクリーンルーム内（温度23  
5℃±2℃、湿度65%±5%）で行った。レーザーの波長は780nm、時間幅は200フェムト秒（fs）、レーザー発振の繰り返し周波数は1kHzである。レーザー光強度は、波長板と偏光子により調節した。レーザー光の照射回数は、シャッターの開閉時間を変化させることにより調整した。

10

タンパク質溶液10μlを、結晶化プレート110のそれぞれの結晶育成容器部107に入れ、室温にて溶液中にレーザーを集光照射した。レーザーのパルス強度は1.95nJ／パルスであった。シャッターの開閉時間により、8パルス（1／125秒）、62パルス（1／16秒）  
15、24000パルス（24秒）、照射なし（0秒）とし、パルス数を変化させた。

レーザー照射後は18℃に設定した恒温槽内に静置して、その後の結晶成長を観察した。レーザー照射2日後の写真を図8に示す。結晶の析  
20出数が、レーザー照射回数とともに増加した。また、照射していないサンプルにおいて、小さな結晶が非常に多く析出した。これは、高過飽和溶液のために、結晶核が溶液中の至る所で自然発生したためであり、一度に大量の核発生につながった。これは、通常の結晶育成においても、よく観られることであり、結晶の高品質化、大型化の障壁となっている  
25。一方、レーザーを照射したサンプルにおいては、室温の低過飽和溶液内で結晶核が生成し、その核が種結晶となり、成長した。そのため、パ

ルス数が増加すると、結晶核の生成量が増加するため、結果として、結晶析出が増加している。

このように、結晶核の発生はレーザーパルスの照射回数に依存した現象であると考えられる。照射回数の増加により結晶数が増えることは、照射回数の増加により結晶が生成する確率が増加することと同義である。

また、レーザーによる爆発現象が起こるためのレーザー強度が照射回数の増加により減少する現象（インキュベーション効果）が一般に知られている（例えば、S.Preuss 等（Appl. Phys. Lett. 62(23), 7 June 1993 p3049-3051)）。つまり、照射回数の増加により、結晶生成に必要なレーザーパルスの光密度、レーザー強度が減少することが考えられる。本実施例においても、複数発のレーザー照射によるレーザー強度が、ポリスチレン微粒子の動きによって定義したレーザー強度の下限を大きく下回るが、これは蛋白質分子がポリスチレン微粒子よりも遙かに小さいことと、パルスレーザーの複数発照射の効果であると考えられる。ただし、これらは、あくまでも本発明者等の推察であって、本発明の範囲を限定するものではない。

#### （実施例 4）

本実施例は、リボヌクレアーゼ H（17 kDa）の結晶化の実施例である。タンパク質溶液は、5 mg/ml のリボヌクレアーゼ H を、0.05 M のトリス塩酸緩衝液（pH 9.0）に、室温で溶解することで調製した。その後、メンブランフィルタにて不純物を除去した。また、サーバー液（外液）として、0.2 M のトリス塩酸、pH 9.0 を作成した。レーザー照射による結晶化は、図 6 に示すレーザー照射装置および結晶化プレートを用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法にて行った。

- すなわち、タンパク質溶液  $10 \mu\text{l}$  を結晶育成容器部 107 に入れ、  
サーバー溶液部 106 に  $100 \mu\text{l}$  の外液を分注した。そして、室温に  
てタンパク質溶液中にレーザーを集光照射した。レーザーの照射は、温  
5 度・湿度管理したクリーンルーム内（温度  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $65\% \pm 5\%$ ）で行った。レーザーの波長は  $780 \text{ nm}$ 、時間幅は  $200 \text{ fs}$ 、レーザー発振の繰り返し周波数は  $1 \text{ kHz}$  である。レーザー光強度は、波長板と偏光子により調節した。レーザー光の照射回数は、シャッターの開閉時間を変化させることにより調整した。レーザーの  
10 パルス強度は  $1.95 \text{ nJ}$  / パルスであった。シャッターの開閉時間により、8 パルス（ $1/125 \text{ 秒}$ ）、62 パルス（ $1/16 \text{ 秒}$ ）、4000 パルス（ $4 \text{ 秒}$ ）、8000 パルス（ $8 \text{ 秒}$ ）、照射なし（ $0 \text{ 秒}$ ）とし、パルス数を変化させた。
- 15 レーザー照射後は  $14^{\circ}\text{C}$  に設定した恒温槽内に静置して、その後の結晶成長を観察した。レーザー照射 1 日後の写真を図 9 に示す。照射していないサンプルにおいては、結晶の析出が 2 週間以上経っても見られなかった。しかしながら、レーザーの照射条件により析出状態に違いが見られた。8 パルスでは、結晶核が生成しなかったのに対して、62 パルスと 4000 パルスを照射した溶液からは、結晶の析出が観測できた。  
20 また、8000 パルスを照射した溶液内には、変性したりボヌクレアーゼ H が見られた。

#### （実施例 5）

- 25 本実施例は、グルコースイソメラーゼ（ $173 \text{ kDa}$ ）の結晶化の実施例である。タンパク質溶液は、 $20 \text{ mg/ml}$  のグルコースイソメラ

ーゼを、0.2 Mの硫酸アンモニウム溶液（pH 7.0）に室温で溶解して調製した。その後、メンブランフィルタにて不純物を除去した。また、サーバー液（外液）として、0.2 Mの硫酸アンモニウム、15%のポリエチレングリコール（PEG）6000を溶解した溶液（pH 7.5）を調製した。レーザー照射による結晶化は、図6に示すレーザー照射装置および結晶化プレートを用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法にて行った。

すなわち、タンパク質溶液10  $\mu$ lを結晶育成容器部107に入れ、  
10 サーバー溶液部106に100  $\mu$ lの外液を分注した。その後、サーバー溶液部106から5  $\mu$ lをピペットにて吸い上げ、結晶育成容器部107に注入し、タンパク質溶液とサーバー溶液を十分混ぜた。そして、室温にてタンパク質溶液中にレーザーを集光照射した。レーザーの照射は、温度・湿度管理したクリーンルーム内（温度23℃ $\pm$ 2℃、湿度65% $\pm$ 5%）で行った。レーザーの波長は780 nm、時間幅は200フェムト秒（fs）、レーザー発振の繰り返し周波数は1 kHzである。レーザー光強度は、波長板と偏光子により調節した。レーザー光の照射回数は、シャッターの開閉時間を変化させることにより調整した。レーザーのパルス強度は1.95 nJ／パルスであった。シャッターの開閉  
15 時間により、8パルス（1／125秒）、4000パルス（4秒）、照射なし（0秒）とし、パルス数を変化させた。

レーザー照射後は18℃に設定した恒温槽内に静置して、その後の結晶成長を観察した。レーザー照射1日後の写真を図10に示す。レーザーを照射した溶液からは結晶の析出が観察できたが、照射していないサンプルにおいては、結晶の析出が1ヶ月以上経っても見られなかった。

本実施例では、分子量が約 20 万の巨大タンパク質であるグルコースイソメラーゼを結晶化できた。このことにより、レーザー照射を利用する本発明の方法は、このような巨大タンパク質の結晶化にも有効だといえる。

5

(実施例 6)

本実施例は、トリパノソーマ由来プロスタグランジン F<sub>2</sub> α 合成酵素 (31 kDa) の結晶化の実施例である。タンパク質溶液は、20 mg / ml の前記合成酵素を、0.005 M のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸 (NADP<sup>+</sup>) と共に、0.04 M のトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に室温で十分溶解させて、調製した。その後、メンブ  
10 ランフィルタにて不純物を除去した。また、サーバー溶液 (外液) として、0.01 M のヘペス水酸化ナトリウム緩衝液 (HEPES-NaOH)、2 % のポリエチレングリコール (PEG) 400、1.2 M の硫酸  
15 アンモニウムの溶液 (pH 7.5) を調製した。

レーザー照射による結晶化は、図 7 に示すレーザー照射装置および結晶化容器を用い、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて行った。図示のように、このレーザー照射装置では、フェムト秒レーザー照射装置 101  
20 から照射されたレーザーが、ミラー 102、波長板 103、偏光子 104 およびシャッター 105 を通過して対物レンズ (10 倍) 108 で集光され、結晶化容器 118 の結晶溶液 117 に照射されるようになっている。そして、前記結晶溶液 117 は、接眼レンズ 112 で肉眼で観察できるようになっており、また CCD 113 カメラおよびモニター 11  
25 4 によっても観察可能となっている。同図において、116 は外液であり、115 はガラス板であり、119 はグリースである。

図示のように、タンパク質溶液  $2 \mu\text{l}$  と外液  $2 \mu\text{l}$  を混合した結晶化溶液の液滴をガラス板 115 上に形成した。結晶化容器 118 に外液 116 を  $500 \mu\text{l}$  入れ、前記結晶化溶液の液滴 117 を吊り下げよう  
5 にしてガラスで蓋をした。このとき、グリース 119 を用いて密封させた。外液 116 が落下しないように注意しながら、結晶化容器 118 を逆さにし、結晶化溶液の液滴 117 中にレーザーを集光照射した。レーザーの照射は、温度・湿度管理したクリーンルーム内（温度  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $65\% \pm 5\%$ ）で行った。レーザーの波長は  $780 \text{ nm}$ 、時間  
10 幅は  $200 \text{ fs}$ 、レーザー発振の繰り返し周波数は  $1 \text{ kHz}$  である。レーザー光強度は、波長板と偏光子により調節した。レーザー光の照射回数は、シャッターの開閉時間を変化させることにより調整した。レーザーのパルス強度は  $1.95 \text{ nJ/pulse}$  であった。シャッターの開閉により  $62 \text{ pulses}$ （ $1/16 \text{ sec}$ ）を照射した。対象実験とし  
15 て、レーザー照射なしサンプルを育成した。

レーザー照射後は、 $20^{\circ}\text{C}$  に設定した恒温槽内に静置して、その後の結晶成長を観察した。レーザー照射 7 日後の写真を図 11 に示す。レーザーを照射した溶液からは結晶の析出が観察できたが、照射していない  
20 サンプルにおいては、結晶の析出が 3 ヶ月以上経っても見られなかった。本実施例では、レーザー照射により短期間で結晶が生じた。

#### （実施例 7）

本実施例は、アデノシンデアミナーゼ（ADA）ネイティブの結晶化の実  
25 施例である。タンパク質溶液は、 $20 \text{ mg/ml}$  の ADA ネイティブ、を  $0.0025 \text{ M}$  のヘ pes 緩衝液（ $\text{pH } 7.5$ ）に室温で溶解することによ

り調製した。その後、メンブランフィルタにて不純物を除去した。また、サーバー溶液（外液）として、① 0.2 M のクエン酸ナトリウム、0.1 M のカコジル酸ナトリウムおよび 30 % イソプロパノールの溶液（pH 6.5）と② 0.2 M の酢酸アンモニウム、0.1 M のクエン酸ナトリウムおよび 30 % のポリエチレングリコール（PEG）4000 の溶液（pH 5.6）を調製した。

レーザー照射による結晶化は、図 6 に示すレーザー照射用および結晶化プレートを使用し、シッティングドロップ蒸気拡散法にて行った。タンパク質溶液 2  $\mu$ l を結晶育成容器部 107 に入れ、サーバー溶液部 106 に 100  $\mu$ l の外液①と②をそれぞれ分注した。その後、サーバー溶液部 106 から 2  $\mu$ l をピペットにて吸い上げ、結晶育成容器部 107 に注入した。タンパク質溶液と外液が十分に混ざった後、室温にてタンパク質溶液中にレーザーを集光照射した。レーザーのパルス強度は 1.95 nJ / パルスであった。シャッターの開閉により、1000 パルス（1 秒）を照射した。対象実験として、照射なしサンプルを育成した。

レーザー照射後は 20 °C に設定した恒温槽内に静置して、その後の結晶成長を観察した。レーザー照射 7 日後の写真を図 12 に示す。レーザーを照射した溶液からは結晶の析出が観察できたが、照射していないサンプルにおいては、結晶の析出が 1 ヶ月以上経っても見られなかった。本タンパク質に関して、これまでに結晶が得られたことはなく、本実施例において、初めて結晶化が実現できた。

（実施例 8）

本実施例は、大腸菌主要異物排出トランスポーター (AcrB) を結晶化した例である。AcrBはポリトピック型膜タンパク質であり、1049アミノ酸残基からなる単量体が、3個絡み合った3量体タンパク質である。

- 5     タンパク質溶液は、28mg/mlのヒスチジン標識を付けたAcrBに、0.02Mの燐酸ナトリウム (pH 6.2)、10%グリセロールおよび0.2%ドデシルマルトシドを添加して、調製した。サーバー液 (外液) として、14.1~14.6%のポリエチレングリコール (PEG) 4000、0.08Mの燐酸ナトリウム (pH 6.2) と、0.02
- 10    Mのクエン酸ナトリウム-塩酸 (pH 5.6) とを調製した。

レーザー照射による結晶化は、図6に示す結晶化容器と装置を使用し、シッティングドロップ蒸気拡散法にて行った。

- タンパク質溶液2μlを、結晶育成容器部107に入れ、サーバー溶
- 15   液部106に50μlの前記外液を分注した。その後、サーバー溶液部106から2μlをピペットにて吸い上げ、結晶育成容器部107に注入し、タンパク質溶液と外液を十分に混合した。本実施例では、PEG 4000の濃度を14.1%から14.6%までの0.1%刻みで6条件の育成溶液を準備し、それぞれの育成溶液で結晶化を行った。その後
- 20   、温度・湿度管理したクリーンルーム内 (温度23℃±2℃、湿度65%±5%) にて高出力フェムト秒チタンサファイアレーザーを対物レンズ (倍率10倍) により集光し、タンパク質溶液中に照射した。レーザーの波長は780nm、時間幅は200フェムト秒 (fs)、レーザー発振の繰り返し周波数は1kHz、レーザーのパルス強度は800nJ/
- 25   パルスであった。シャッターの開閉時間により、250パルス (1/4秒) を照射した。対象実験として、照射なしサンプルを育成した。

レーザー照射後は25℃に設定した恒温槽内に静置して、その後の結晶成長を観察した。レーザー照射2日後の写真を図13に示す。図示のように、ポリエチレングリコール(PEG)4000の濃度を変えて結晶育成溶液を調製したが、いずれの育成溶液においてもレーザーを照射した溶液からは結晶の析出が観察できたが(図13において矢印で示す)、照射しないサンプルからは、1週間後においても結晶の析出が確認できなかった(図示せず)。

膜タンパク質は、結晶化が困難であるが、本実施例では、膜タンパク質の結晶化が実現できた。

#### (参考例2)

この参考例は、容器を運動させてタンパク質を結晶化した例である。

ニワトリ卵白リゾチームの結晶育成において、溶液攪拌を行った。タンパク質溶液は蒸留水50ml、酢酸ナトリウム三水和物0.467gの中に酢酸を加えpH4.5に調整した後、塩化ナトリウム1.25gおよびニワトリ卵白リゾチーム1.25gを追加したものをを用いた。室温で調整した溶液を、100mlのテフロン容器に入れ、恒温水槽にて40℃で24時間保持し、完全に溶解させた。その後、25℃まで5時間で冷却し、穴径0.2μmのメンブランフィルターにて不純物を除去した。一方、リザーバー溶液は蒸留水50ml、酢酸ナトリウム三水和物0.467gの中に酢酸を加えpH4.5に調整した後、塩化ナトリウム3gを追加したものをを用いた。

タンパク質溶液3μlおよび10μlに対して、リザーバー溶液を300μlとし、溶液攪拌の有無による違いを調べた。結晶化手法は、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いた。また、フロリナート(前記タンパク質溶液も比重が重い液)を用いた2液界面での結晶育成であるフローティン

グドロップ蒸気拡散法についても同時に実験を行った。フロリナート溶液量は $10\mu\text{l}$ である。結晶育成は $20^{\circ}\text{C}$ 一定温度で行った。

攪拌機構はロータリー振盪器（タイテック製BR-15）を用いた。回転速度は、溶液が緩やかに攪拌される $50\text{ rpm}$ に設定した。この攪拌装置の模式図を図14に示す。図示のように、振盪器202に、ウエルプレート201を載せて回転運動させて攪拌した。また、ウエルプレート201の各ウエルは、2つの小ウエルと1つの大ウエルとから構成されている。Floating-drop法を適用する小ウエルには、前記タンパク質溶液およびフロリナート214が入れてあり、Sitting-drop法を適用する小ウエルでは、前記タンパク質溶液212が入れられている。また、大ウエルでは、リゾチウム以外の成分が高濃度で溶解しているリザーバー溶液213が入れられている。この方法では一度にたくさんの溶液を簡便に攪拌することができる。

結晶の育成結果を図15に示す。溶液攪拌の有無で結晶析出数と結晶サイズに明らかな違いが生じた。図15A、Bに示すように、溶液を攪拌しない従来法においては、非常に小さい結晶（微結晶）が数多く析出した。一方、図15C、Dに示すように、溶液攪拌した育成では、結晶の析出数が少なく大きな結晶が得られた。また、溶液攪拌シッティングドロップ法（図15C参照）に比べて、溶液攪拌フローティングドロップ法（図15D）の方が結晶の析出がより少なく、結晶サイズも大きかった。

つぎに、本発明の容器の実施例について、図に基づき説明する。

## 25 （実施例9）

図16の断面図に、本発明の第1の容器の一例を示す。図示のように、

この容器 3 0 1 は、第 1 の部屋 3 1 1 と第 2 の部屋 3 1 3 を有し、前記  
両部屋は、通路で連通している。この容器 3 0 1 の上部は、蓋体 3 1 6  
で覆われて密閉状態となっており、また前記容器 3 0 1 の底部 3 1 5 は、  
レーザー光 3 1 7 が透過できるように、前記第 1 の部屋に該当する部分  
5 が透明若しくは半透明になっている。この底の部分の材質は、レーザー  
光を通せば、特に制限されず、例えば、アクリル樹脂等の透明樹脂、石  
英ガラス、ガラス等の透明部材が使用できる。また、その他の部分の部  
材は、特に制限されず、一般の樹脂やガラス等が使用できる。この容器  
全体の大きさは、特に制限されず、例えば、縦 2 0 ~ 1 8 0 mm × 横 1  
10 0 ~ 1 2 0 × 高さ 3 ~ 5 0 mm、好ましくは、縦 4 0 ~ 1 5 0 mm × 横  
2 0 ~ 1 0 0 × 高さ 5 ~ 3 0 mm、より好ましくは縦 5 0 ~ 1 3 0 mm  
× 横 3 0 ~ 8 0 × 高さ 1 0 ~ 2 0 mm である。第 1 の部屋 3 1 1 には、  
タンパク質溶液等の溶液 3 1 2 が入れられ、第 2 の部屋 3 1 3 には、リ  
ザーバー溶液 3 1 4 が入れられるため、第 1 の部屋 3 1 1 は、第 2 の部  
15 屋 3 1 3 の部屋より小さいほうがよい。この容器 3 0 1 は、例えば、つ  
ぎのようにして使用される。

まず、蓋体 3 1 6 を外して、第 1 の部屋 3 1 1 にタンパク質溶液等の  
高分子溶液 3 1 2 を入れ、第 2 の部屋 3 1 3 にリザーバー溶液 3 1 4 を  
20 入れ、蓋体 3 1 6 で蓋をして密閉する。すると、同図において矢印で示  
すように、高分子溶液 3 1 2 から発生した水蒸気が通路を通過して第 2 の  
部屋 3 1 3 に移行し、これによって高分子溶液 3 1 2 の溶媒の蒸発が促  
進される。そして、高分子溶液 3 1 2 が過飽和状態になったら、結晶核  
を強制的に生成させるため、容器 3 0 1 の底部から、例えば、パルスレ  
25 ーザー光 3 1 7 を高分子溶液 3 1 2 に照射する。結晶核が生成すれば、  
そのまま、結晶を成長させればよいし、結晶核が生成しなければ、その

条件は、結晶化に不適と判断して、別の条件で結晶化を試みればよい。

- 5        このように、パルスレーザーを照射して結晶核の生成を観察し、結晶核が生成すれば、その溶液等の条件は、結晶化に適していると判断できるし、そのまま育成すれば結晶が得られる。また、パルスレーザーを照射して溶質の状態を観察し、溶質が変化していれば、その溶液等の条件は結晶化に適していると判断できる。前記溶質の変化は、タンパク質の場合、例えば、立体構造の変化（変性）である。

- 10        本発明の容器において、レーザーの種類、照射条件等は、本発明の製造方法等で記載したとおりであり、これらのレーザーの条件などは、本発明の他の容器若しくはプレートでも共通である。

（実施例 10）

- 15        つぎに、一つのプレート内に前記第 1 の容器を複数形成した例を、図 17 の斜視図に示す。

- 20        図示のように、このプレート 302 は、6 個の第 1 の容器 321 が形成されており、これは、第 1 の部屋 321 a と第 2 の部屋 321 b を有し、前記両部屋は通路で連通している。また、このプレート 302 は、前記第 1 の容器 321 が形成されたプレート本体 322、底部 323 および蓋体 324 とから構成されている。底部 323 は、レーザー光 325 が照射可能なように透明若しくは半透明部材から形成されている。このプレート 302 の形成材料および容器 321 の大きさ等については、  
25        前述の第 1 の容器と同様である。また、このプレート 302 の大きさは、特に制限されず、例えば、縦 20 ～ 180 mm × 横 10 ～ 120 × 高さ

3 ~ 50 mm、好ましくは、縦 40 ~ 150 mm × 横 20 ~ 100 × 高さ 5 ~ 40 mm、より好ましくは縦 50 ~ 130 mm × 横 30 ~ 80 × 高さ 10 ~ 30 mm である。このプレート 302 において、容器 321 の個数は 6 個であるが、本発明はこれに限定されず、プレートあたり、  
5 容器数 1 ~ 1536 個、好ましくは 2 ~ 384 個、より好ましくは 4 ~ 96 個である。このプレート 302 は、例えば、つぎのようにして使用される。

すなわち、まず、容器 321 部分の第 1 の部屋 321 a に高分子溶液  
10 を入れ、第 2 の部屋 321 b にリザーバー溶液を入れると、蒸気拡散により、高分子溶液の溶媒の蒸発が促進される。そして、高分子溶液が過飽和状態となったら、前述のように、パルスレーザー 325 を照射して、結晶核を強制的に生成させる。結晶核が生成したら、これを育成して目的とする高分子結晶を得ることができる。また、結晶核が生成しない場  
15 合は、結晶化条件が不適当と判断して、次の条件で結晶化を試みる。このプレートでは、複数の容器が形成されているから、高分子溶液の濃度を変えるなど容器毎に異なる結晶化条件を設定でき、また、容器毎に異なる条件でレーザーを照射できる。

## 20 (実施例 11)

つぎに、本発明の第 2 の容器の一例を図 18 に示す。同図において、  
(A) は、平面図であり、(B) は断面図である。

図示のように、この容器 303 は、円盤の底に円柱が結合した形状で  
25 ある。前記円盤の周辺部には、円中心から放射状に 8 個の第 1 の部屋 331 が形成され、前記円柱の中には、1 つの第 2 の部屋 332 が形成さ

れており、前記第1の部屋331のそれぞれから通路333が延びて、第2の部屋332と連通している。前記8個の通路333において、各通路333は、それぞれ通路径が異なっている。この容器303全体の大きさは、特に制限されず、第1の部屋の大きさと個数や、第2の部屋

5 の大きさ等により適宜決定される。前記第1の部屋の大きさは、例えば、内径0.5～10mm、深さ1～50mm、好ましくは、内径1～5mm、深さ3～40mm、より好ましくは内径1～3mm、深さ3～30mm、であり、第1の部屋の個数は、例えば、1～1536個、好ましくは2～384個、より好ましくは4～96個である。前記第2の部屋

10 の大きさは、例えば、内径1～30mm、深さ1～50mm、好ましくは、内径2～20mm、深さ2～40mm、より好ましくは内径3～15mm、深さ3～30mmである。前記通路の長さも制限されず、例えば、0.5～50mm、好ましくは1～30mm、より好ましくは1～20mmである。また、この通路は、その通路径がそれぞれ異なるが、

15 例えば、0.3～10mm、好ましくは0.5～5mm、より好ましくは0.5～3mmである。この容器303の材質も特に制限されず、例えば、樹脂やガラスなどで構成されるが、第1の部屋にレーザーを照射する場合は、その部分をレーザーが透過するように、前述の透明若しくは半透明部材で構成すればよい。この容器303は、例えば、つぎのよ

20 うにして使用する。

すなわち、まず、複数の第1の部屋331に高分子溶液334を入れ、第2の部屋332にリザーバー溶液335を入れると、図中の矢印で示すように、高分子溶液334から発生した水蒸気が通路333を通り、

25 第2の部屋332に移動するという蒸気拡散により、高分子溶液334の溶媒の蒸発が促進される。この蒸気拡散において、通路333の通路

径がそれぞれ異なるため、第1の部屋333のそれぞれの蒸気拡散条件が異なることになる。したがって、複数の第1の部屋において、結晶核が生成したものは、そのまま育成を続けて目的とする高分子結晶を得ることができる。また、結晶核が生じない第1の部屋は、結晶化条件が不適と判断することができる。さらに、高分子溶液334が過飽和状態となったら、前述のように、パルスレーザーを照射して、結晶核を強制的に生成させてもよい。結晶核が生成したら、これを育成して目的とする高分子結晶を得ることができる。また、結晶核が生成しない場合は、結晶化条件が不適当と判断して、次の条件で結晶化を試みる。

10

(実施例12)

つぎに、本発明の第2の容器のその他の例を図19に示す。同図において、(A)は、平面図であり、(B)は断面図である。

15 図示のように、この容器304は、円盤の底に円柱が結合した形状である。前記円盤の周辺部には、円中心から放射状に8個の第1の部屋341が形成され、前記円柱の中には、1つの第2の部屋342が形成されており、前記第1の部屋341のそれぞれから通路343が延びて、第2の部屋342と連通している。前記8個の通路343において、各  
20 通路333は、それぞれ通路長が異なっている。この容器304全体の大きさは、特に制限されず、第1の部屋の大きさと個数や、第2の部屋の大きさ等により適宜決定される。前記第1の部屋の大きさは、例えば、内径0.5～10mm、深さ1～50mm、好ましくは、内径1～5mm、深さ3～40mm、より好ましくは内径1～3mm、深さ3～30  
25 mm、であり、第1の部屋の個数は、例えば、1～1536個、好ましくは2～384個、より好ましくは4～96個である。前記第2の部屋

の大きさは、例えば、内径 1 ～ 30 mm、深さ 1 ～ 50 mm、好ましくは、内径 2 ～ 20 mm、深さ 2 ～ 40 mm、より好ましくは内径 3 ～ 15 mm、深さ 3 ～ 30 mm である。前記通路の長さも制限されず、例えば、0.5 ～ 50 mm、好ましくは 1 ～ 30 mm、より好ましくは 1 ～ 20 mm である。また、この通路は、その通路径がそれぞれ異なるが、例えば、0.3 ～ 10 mm、好ましくは 0.5 ～ 5 mm、より好ましくは 0.5 ～ 3 mm である。この容器 4 の材質も特に制限されず、例えば、樹脂やガラスなどで構成されるが、第 1 の部屋にレーザーを照射する場合は、その部分をレーザーが透過するように、前述の透明若しくは半透明部材で構成すればよい。この容器 304 は、例えば、つぎのようにして使用する。

すなわち、まず、複数の第 1 の部屋 341 に高分子溶液 344 を入れ、第 2 の部屋 342 にレーザー溶液 345 を入れると、図中の矢印で示すように、高分子溶液 344 から発生した水蒸気が通路 343 を通り、第 2 の部屋 342 に移動するという蒸気拡散により、高分子溶液 344 の溶媒の蒸発が促進される。この蒸気拡散において、通路 343 の通路長がそれぞれ異なるため、第 1 の部屋 343 のそれぞれの蒸気拡散条件が異なることになる。したがって、複数の第 1 の部屋において、結晶核が生成したものは、そのまま育成を続けて目的とする高分子結晶を得ることができる。また、結晶核が生じない第 1 の部屋は、結晶化条件が不適と判断することができる。さらに、高分子溶液 344 が過飽和状態になったら、前述のように、パルスレーザーを照射して、結晶核を強制的に生成させてもよい。結晶核が生成したら、これを育成して目的とする高分子結晶を得ることができる。また、結晶核が生成しない場合は、結晶化条件が不適当と判断して、次の条件で結晶化を試みる。

なお、実施例 1 1 では、通路径を変化させ、実施例 1 2 では、通路長を変化させたが、これらを組み合わせてもよい。また、実施例 1 1 の容器、実施例 1 2 の容器およびこれらの組み合わせの容器の少なくとも一つを、1つのプレート内に複数形成してもよい。このプレートの大きさ等の条件は、例えば、実施例 1 0 のプレートと同様である。

(実施例 1 3)

つぎに、本発明の第 3 の容器の一例を、図 2 0 に示す。図示のように、  
10 この容器 3 0 5 は、大容器 3 5 1 の中に、小容器 3 5 2 が配置された構成となっている。大容器 3 5 1 は、円柱状であり、その上部は、蓋体で蓋がされている。前記小容器 3 5 2 は、逆円錐台形状本体部（大容積部）と、この本体部分の上部と連結する円筒部（小容積部）とからなり、前記円筒部の先端は開口している。大容器 3 5 1 の内壁と小容器 3 5 2 の  
15 外壁との間の空間が、リザーバー溶液 3 5 4 を入れる第 2 の部屋である。また、小容器 5 1 の内部若しくはその円筒部先端口付近が、高分子溶液 3 5 5 を入れる若しくは保持する第 1 の部屋となる。この容器 3 0 5 の大きさは、特に制限されない。前記大容器 3 5 1 の大きさは、例えば、内径 3 ～ 3 0 mm で深さ 5 ～ 1 0 0 mm であり、好ましくは、内径 5 ～  
20 2 5 mm で深さ 1 0 ～ 5 0 mm であり、より好ましくは、内径 1 0 ～ 2 0 mm で深さ 1 0 ～ 3 0 mm である。小容器 3 5 2 の大きさは、例えば、逆円錐台形状本体部（大容積部）において、最大内径 3 ～ 3 0 mm、最小内径 0. 3 ～ 5 mm、高さ 4 ～ 9 0 mm、前記円筒部（小容積部）において、内径 0. 3 ～ 5 mm、高さ 0. 1 ～ 5 mm であり、好ましくは、  
25 逆円錐台形状本体部（大容積部）において、最大内径 5 ～ 2 5 mm、最小内径 0. 5 ～ 3 mm、高さ 9 ～ 4 5 mm、円筒部（小容積部）におい

て、内径 0.5 ～ 3 mm、高さ 0.1 ～ 3 mm であり、より好ましくは、逆円錐台形状本体部（大容積部）において、最大内径 10 ～ 20 mm、最小内径 1 ～ 2 mm、高さ 9 ～ 25 mm、円筒部（小容積部）において、内径 1 ～ 2 mm、高さ 0.1 ～ 2 mm である。また、容器 305 の材質は、特に制限されず、例えば、樹脂、ガラス等が使用できる。この容器において、レーザー光を照射する場合は、レーザー光が通過する部分は透明若しくは半透明の部材で構成され、そのような部材としては、前述のものがあげられる。この容器 305 は、例えば、つぎのようにして使用する。

10

すなわち、まず、大容器 351（第の部屋 353）にリザーバー溶液 354 を入れ、小容器 352 は、非混合性高比重液 356 で満たす。また、小容器 352 の底部には、マグネット攪拌子 307 を配置する。そして、小容器 352 の円筒部先端に、高分子溶液 355 の液滴を配置する。この状態で、容器 305 をマグネットスターラー 306 の上に置き、前記攪拌子 307 を回転させる。このようにすれば、リザーバー溶液 354 の作用により、高分子溶液 355 からは水蒸気の発生が促進される。また、攪拌子 307 の回転により、非混合性高比重液 356 が攪拌され、その振動が高分子溶液 355 にも伝わり、間接的に高分子溶液 355 も攪拌され、その結果、結晶核の生成が促進される。そして、高分子溶液の結晶核が生成したら、そのまま育成を続け、目的とする結晶を得てもよいし、結晶核が生成しない場合は、その条件は、結晶化条件に不適と判断し、次の条件で結晶化を試みればよい。さらに、過飽和状態になったら、高分子溶液 355 に、レーザー光を照射してもよい。また、この実施例の容器を、1 つのプレート内に複数形成してもよい。その条件は、例えば、実施例 10 のプレートと同様である。

25

#### 産業上の利用可能性

以上のように、本発明の方法は、タンパク質等の有機物の結晶の製造若しくはスクリーニングに有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. 結晶化対象の溶質が溶解している溶液に対し、ピコ秒パルスレーザーおよびフェムト秒パルスレーザーの少なくとも一方のパルスレーザーを照射することにより結晶核を生成させる結晶核の製造方法。  
5
2. パルスレーザーをレンズで溶液中に集光し、その集光位置で単発若しくは複数発の局所的な爆発現象を生じさせ、これによって結晶核を生成する請求項 1 記載の製造方法。  
10
3. レーザー照射が一回の場合、パルスレーザーの光密度が、 $5 \times 10^5$  (watt) 以上である請求項 1 または 2 記載の製造方法。  
15
4. レーザー照射が一回の場合、パルスレーザーのレーザー強度が、 $60 \text{ nJ} / \text{pulse}$  以上である請求項 1 から 3 のいずれかに記載の製造方法。  
20
5. レーザー照射が 1 秒間に  $1000 \text{ pulse}$  以上場合、パルスレーザーの光密度が、 $1 \times 10^4$  (watt) 以上である請求項 1 または 2 記載の製造方法。  
25
6. レーザー照射が 1 秒間に  $1000 \text{ pulse}$  以上、パルスレーザーのレーザー強度が、 $1.95 \text{ nJ} / \text{pulse}$  以上である請求項 1、2 または 5 に記載の製造方法。  
30
7. パルスレーザーが、フェムト秒パルスレーザーである請求項 1 か

ら 6 のいずれかに記載の製造方法。

8. パルスレーザーの照射回数が、単発から 1 0 0 0 万発である請求項 1 から 7 のいずれかに記載の製造方法。

5

9. 前記溶液が、過飽和溶液である請求項 1 から 8 のいずれかに記載の製造方法。

10 10. 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法により溶液中に結晶核を生成させ、これを基に結晶を成長させる結晶の製造方法。

11. 結晶化対象の溶質が、有機物である請求項 10 記載の製造方法

15 12. 結晶化対象の溶質が、タンパク質である請求項 10 記載の製造方法。

13. 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法を実施するための結晶核製造装置であって、パルスレーザー照射手段を有する装置。

20

14. 結晶化対象の溶質が溶解している溶液に対し、ピコ秒パルスレーザーおよびフェムト秒パルスレーザーの少なくとも一方のパルスレーザーを照射する工程と、前記レーザー照射により結晶核が生成するか否かを判定する工程および前記レーザー照射により溶質が変化しているか否かを判定する工程の少なくとも一方とを含む結晶化条件のスクリーニング方法。

25

15 15. パルスレーザーをレンズで溶液中に集光し、その集光位置で単  
発若しくは複数発の局所的な爆発現象を生じさせ、これによって結晶核  
を生成若しくは溶質の変性を誘起する請求項14記載のスクリーニング  
5 方法。

16. レーザー照射が一回の場合、パルスレーザーの光密度が、 $5 \times 10^5$  (watt) 以上である請求項14または15記載のスクリーニング  
方法。

10

17. レーザー照射が一回の場合、パルスレーザーのレーザー強度が  
、 $60 \text{ nJ/pulse}$  以上である請求項14から16のいずれかに記  
載のスクリーニング方法。

15 18. レーザー照射が1秒間に1000 pulse以上場合、パルスレーザー  
の光密度が、 $1 \times 10^4$  (watt) 以上である請求項14または15記  
載のスクリーニング方法。

19. レーザー照射が1秒間に1000 pulse以上、パルスレーザーの  
20 レーザー強度が、 $1.95 \text{ nJ/pulse}$  以上である請求項14、1  
5または18に記載のスクリーニング方法。

20. パルスレーザーが、フェムト秒パルスレーザーである請求項1  
4から19のいずれかに記載のスクリーニング方法。

25

21. パルスレーザーの照射回数が、単発から1000万発である請

求項 1 4 から 2 0 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

2 2 . 前記溶液が、過飽和溶液である請求項 1 4 から 2 1 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

5

2 3 . 結晶化対象の溶質が、有機物である請求項 1 4 から 2 2 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

2 4 . 結晶化対象の溶質が、タンパク質である請求項 1 4 から 2 2 の  
10 いずれかに記載のスクリーニング方法。

2 5 . 請求項 1 4 から 2 4 のいずれかに記載のスクリーニング方法を実施するためのスクリーニング装置であって、パルスレーザー照射手段を有する装置。

15

2 6 . 前記溶液を入れた容器を運動させることにより前記溶液を攪拌しながら結晶を生成させ、育成する請求項 1 0 記載の製造方法。

2 7 . 前記運動が、回転、振動および揺動のいずれかの運動若しくは  
20 これらを 2 種類以上組み合わせた運動である請求項 2 6 記載の製造方法。  
。

2 8 . 前記容器が、複数のウェルを有するウェルプレートであり、前記各ウェルに前記溶液が入っている請求項 2 6 または 2 7 記載の製造方  
25 法。

29. 前記溶液中の溶媒を蒸発させる、または温度変化させることなどにより過飽和状態にする請求項26から28のいずれかに記載の製造方法。

- 5 30. 前記容器に、前記溶液よりも比重が重い液を入れ、前記比重が重い液と前記溶液との界面で結晶を成長させる請求項26から29のいずれかに記載の製造方法。

- 10 31. 前記溶液の溶質以外の成分が前記溶液より高濃度で溶解したりリザーバー溶液を入れた別の容器を準備し、この容器と前記溶質を入れた容器とにおいて、水蒸気が移動可能な状態で、前記溶質の結晶を発生・成長させる請求項26から30のいずれかに記載の製造方法。

- 15 32. 前記溶液の溶質が、樹脂、タンパク質、糖類、脂質および核酸からなる群から選択される少なくとも一つである請求項26から31のいずれかに記載の製造方法。

- 20 33. 請求項1から12のいずれかに記載の製造方法に使用する容器若しくは請求項14から24のいずれかに記載のスクリーニング方法に使用する容器であって、結晶化対象物質の溶液を入れる第1の部屋と、前記結晶化対象物質の溶液における前記結晶化対象物質以外の成分のみが前記結晶化対象物質の溶液より高濃度で溶解しているリザーバー溶液を入れる第2の部屋と、前記第1の部屋および前記第2の部屋と連通し、  
25 気体が通過可能な通路とを有し、前記第1の部屋の一部若しくは全部が、前記結晶化対象物質の溶液にレーザー光線を照射可能なように透明若しくは半透明である容器。

3 4. 前記結晶化対象物質が、樹脂、タンパク質、糖類、脂質および核酸からなる群から選択される少なくとも一つである請求項 3 3 記載の容器。

5

3 5. 請求項 1 から 1 2 のいずれかに記載の製造方法に使用するプレート若しくは請求項 1 4 から 2 4 のいずれかに記載のスクリーニング方法に使用するプレートであって、請求項 3 3 記載の容器が、複数形成されたプレート。

10

3 6. 前記結晶化対象物質が、樹脂、タンパク質、糖類、脂質および核酸からなる群から選択される少なくとも一つである請求項 3 5 記載のプレート。

15

3 7. 請求項 1 から 1 2 のいずれかに記載の製造方法に使用する容器若しくは請求項 1 4 から 2 4 のいずれかに記載のスクリーニング方法に使用する容器であって、結晶化対象物質の溶液を入れる第 1 の部屋と、前記結晶化対象物質の溶液における前記結晶化対象物質以外の成分のみが前記結晶化対象物質の溶液より高濃度で溶解しているリザーバー溶液  
20 を入れる第 2 の部屋と、前記第 1 の部屋および前記第 2 の部屋と連通し、気体が通過可能な通路とを有し、前記第 1 の部屋が複数あり、これが複数の前記通路により一つ以上の前記第 2 の部屋と連通しており、前記複数の通路において、それぞれ、通路径若しくは通路長の少なくとも一つが異なり、前記第 1 の部屋の一部若しくは全部が、前記結晶化対象物質  
25 の溶液にレーザー光線を照射可能なように透明若しくは半透明である容器。

38. 結晶化対象物質が、樹脂、タンパク質、糖類、脂質および核酸からなる群から選択される少なくとも一つである請求項37記載の容器。

5 39. 請求項1から12のいずれかに記載の製造方法に使用するプレート若しくは請求項14から24のいずれかに記載のスクリーニング方法に使用するプレートであって、請求項37記載の容器が、複数形成されたプレート。

10 40. 請求項1から12のいずれかに記載の製造方法に使用する容器若しくは請求項14から24のいずれかに記載のスクリーニング方法に使用する容器であって、結晶化対象物質の溶液およびこの溶液より比重が重たくかつ前記結晶化対象物質の溶液と混合しない非混合性高比重液を入れる第1の部屋と、前記結晶化対象物質の溶液における結晶化対象  
15 物質以外の成分のみが前記結晶化対象物質の溶液より高濃度で溶解しているリザーバー溶液を入れる第2の部屋とを有し、前記第2の部屋の中に前記第1の部屋が形成され、前記第1の部屋において、下部の大容積部と、これより容積が小さい上部の小容積部とを有し、この上部先端は開口して前記両部屋の間は気体が通過可能であり、少なくとも前記第1  
20 の部屋の上部もしくは先端開口部に結晶化対象物質の溶液を保持し、かつ前記結晶化対象物質の溶液にレーザー照射が可能なように、容器の一部若しくは全部が透明若しくは半透明である容器。

41. 前記第1の部屋において、前記下部の大容積部の形状が逆円錐  
25 台若しくは逆角錐状台であり、前記上部の小容積部の形状が円筒若しくは角筒であり、前記両者が連結している請求項40記載の容器。

4 2. 前記第 1 の部屋において、前記上部の小容積部の先端開口の上に結晶化対象物質の溶液の液滴を形成し、この状態で、前記結晶化対象物質の溶液の溶媒を蒸発させる請求項 4 1 記載の容器。

5

4 3. 前記結晶化対象物質が、樹脂、タンパク質、糖類、脂質および核酸からなる群から選択される少なくとも一つである請求項 4 0 から 4 2 のいずれかに記載の容器。

10 4 4. 請求項 1 から 1 2 のいずれかに記載の製造方法に使用するプレート若しくは請求項 1 4 から 2 4 のいずれかに記載のスクリーニング方法に使用するプレートであって、請求項 4 0 記載の容器が、複数形成されたプレート。

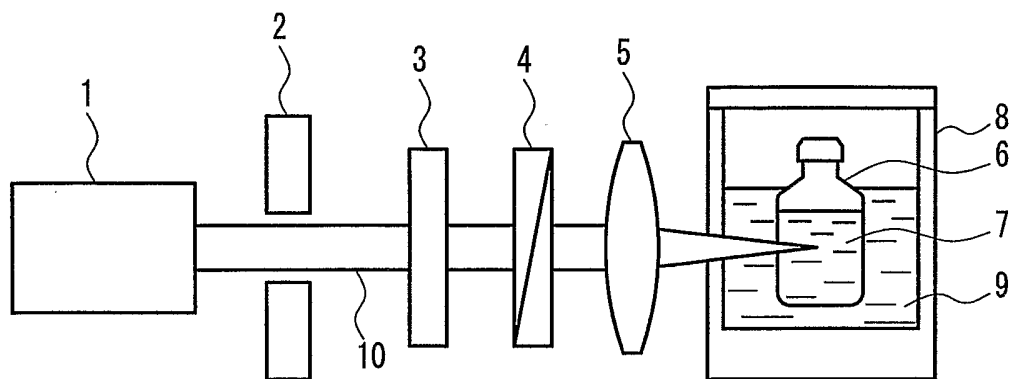


FIG. 1

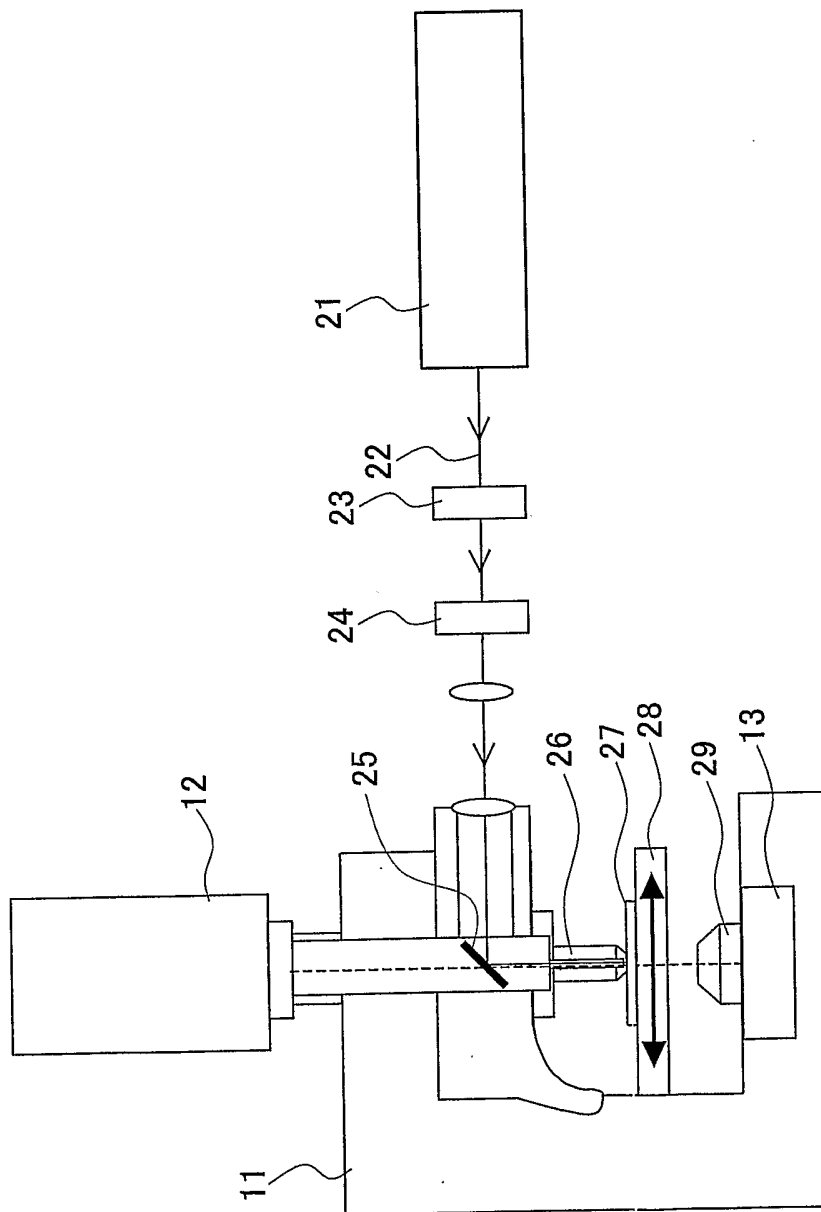


FIG.2

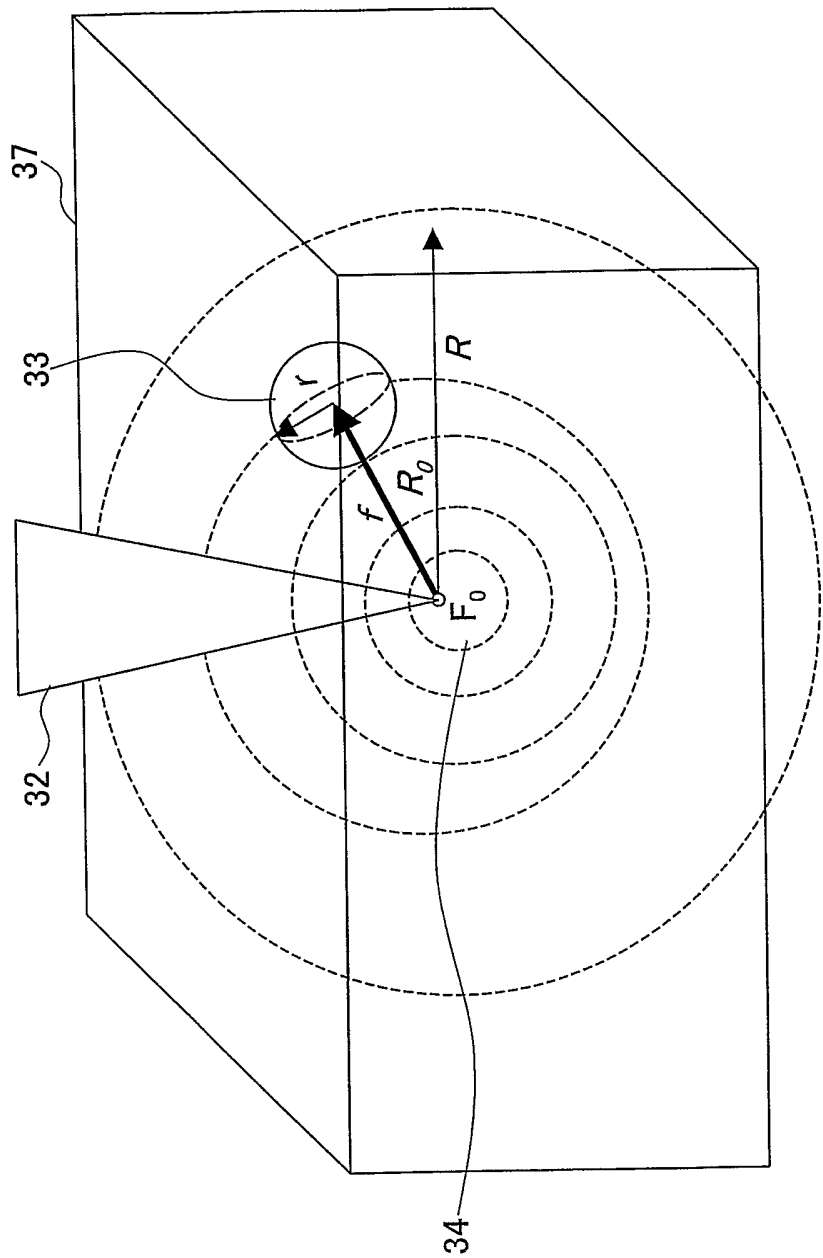


FIG.3

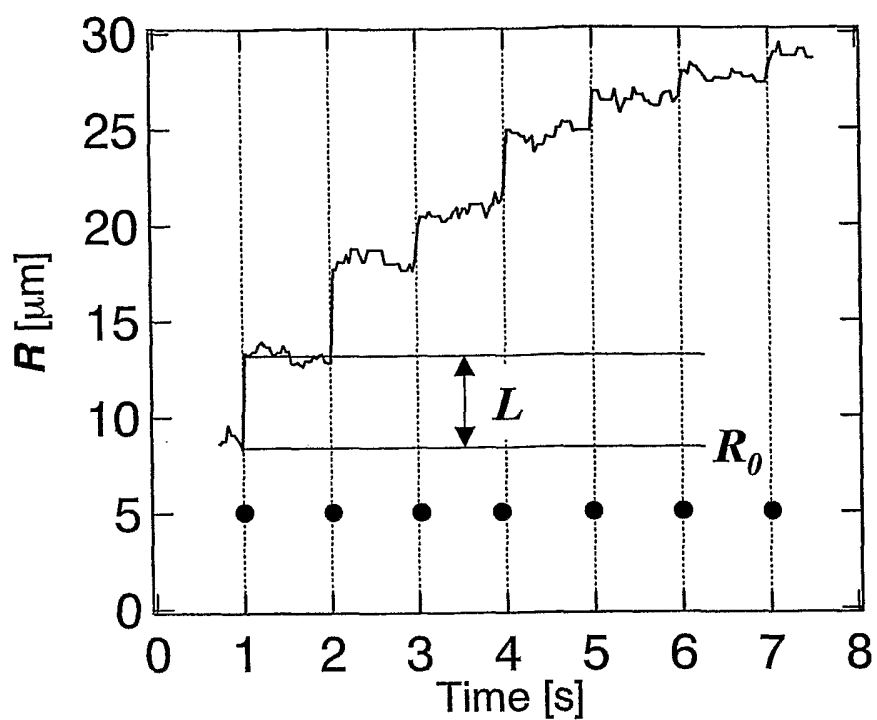


FIG. 4

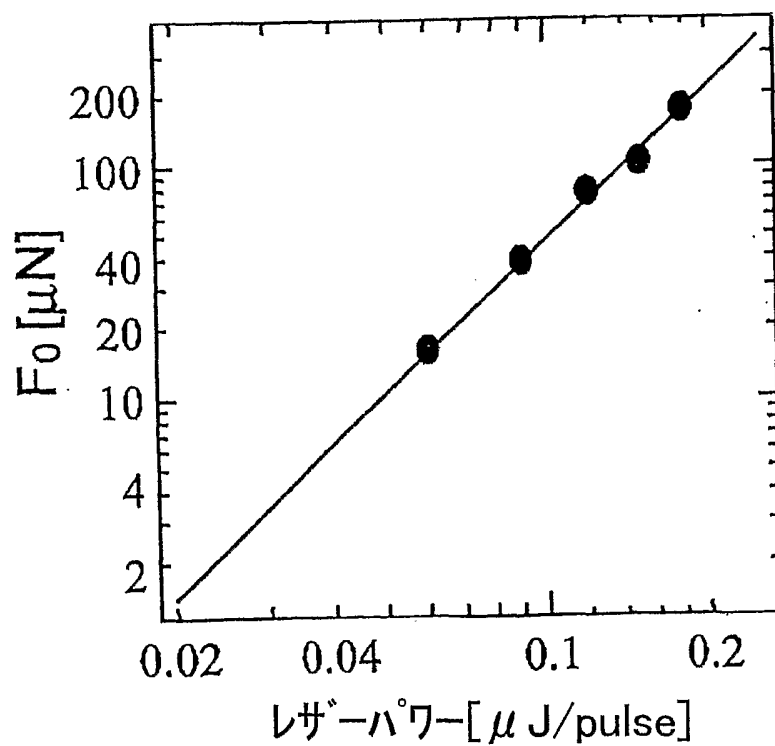


FIG. 5

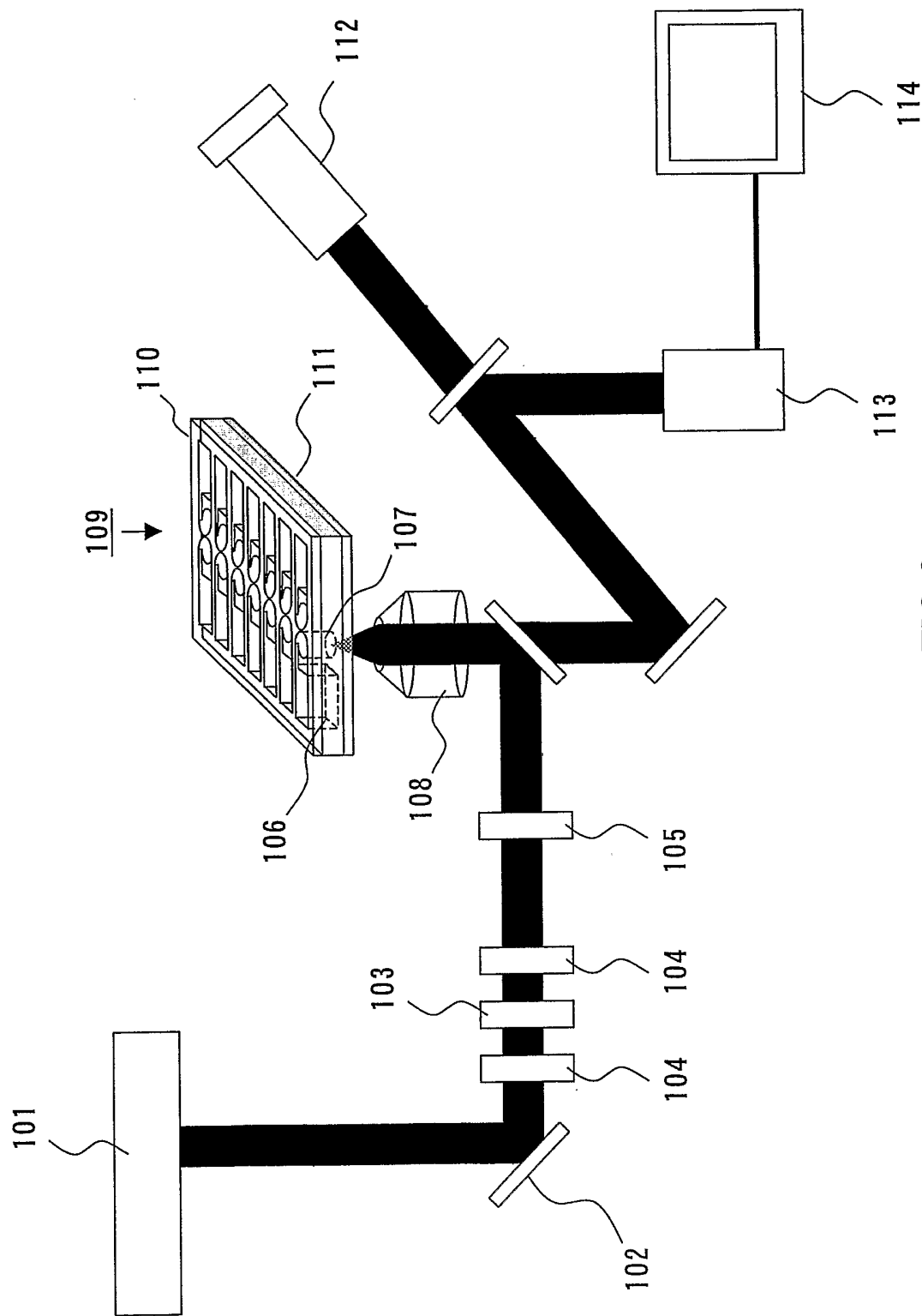


FIG.6

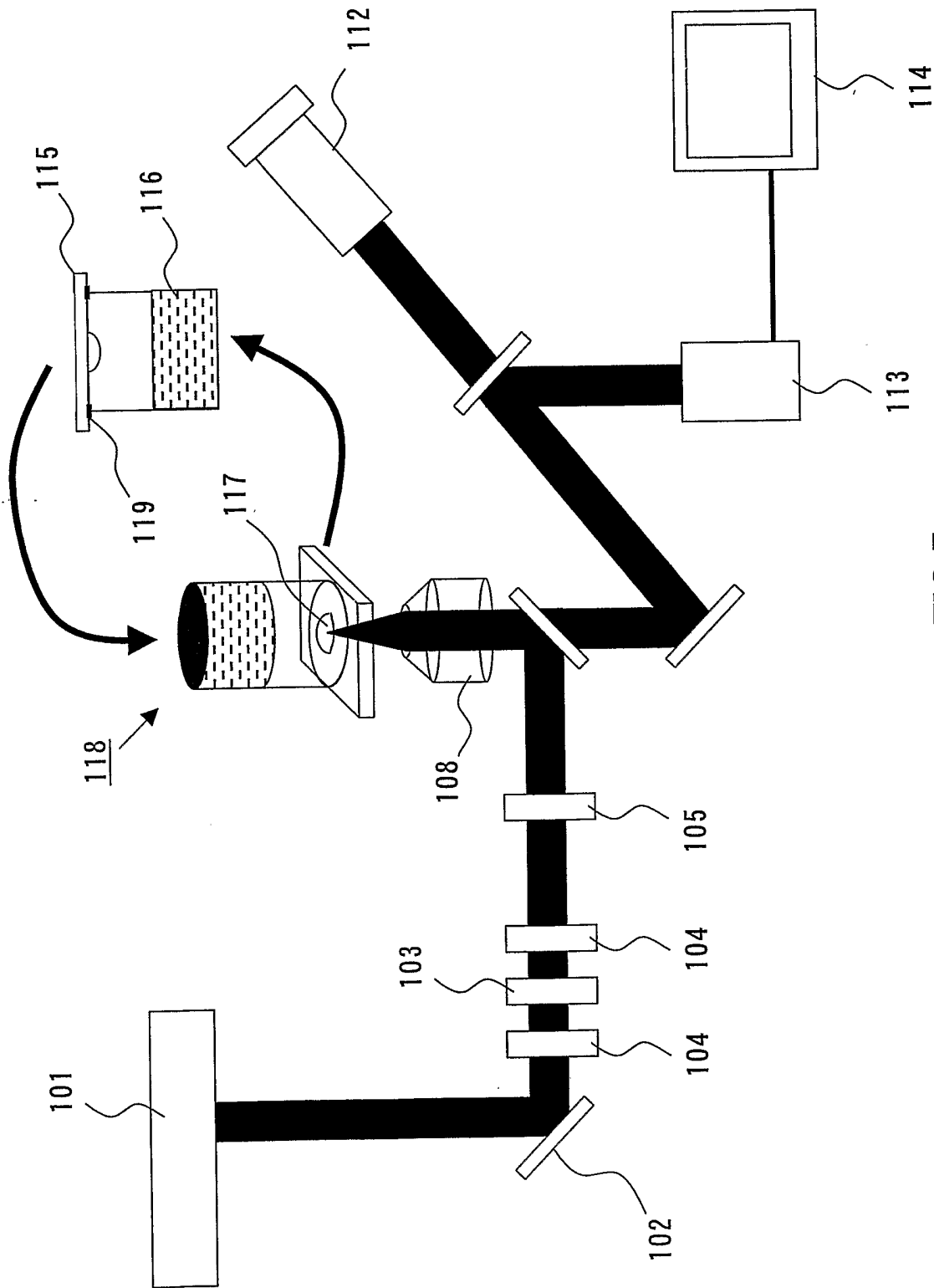


FIG.7

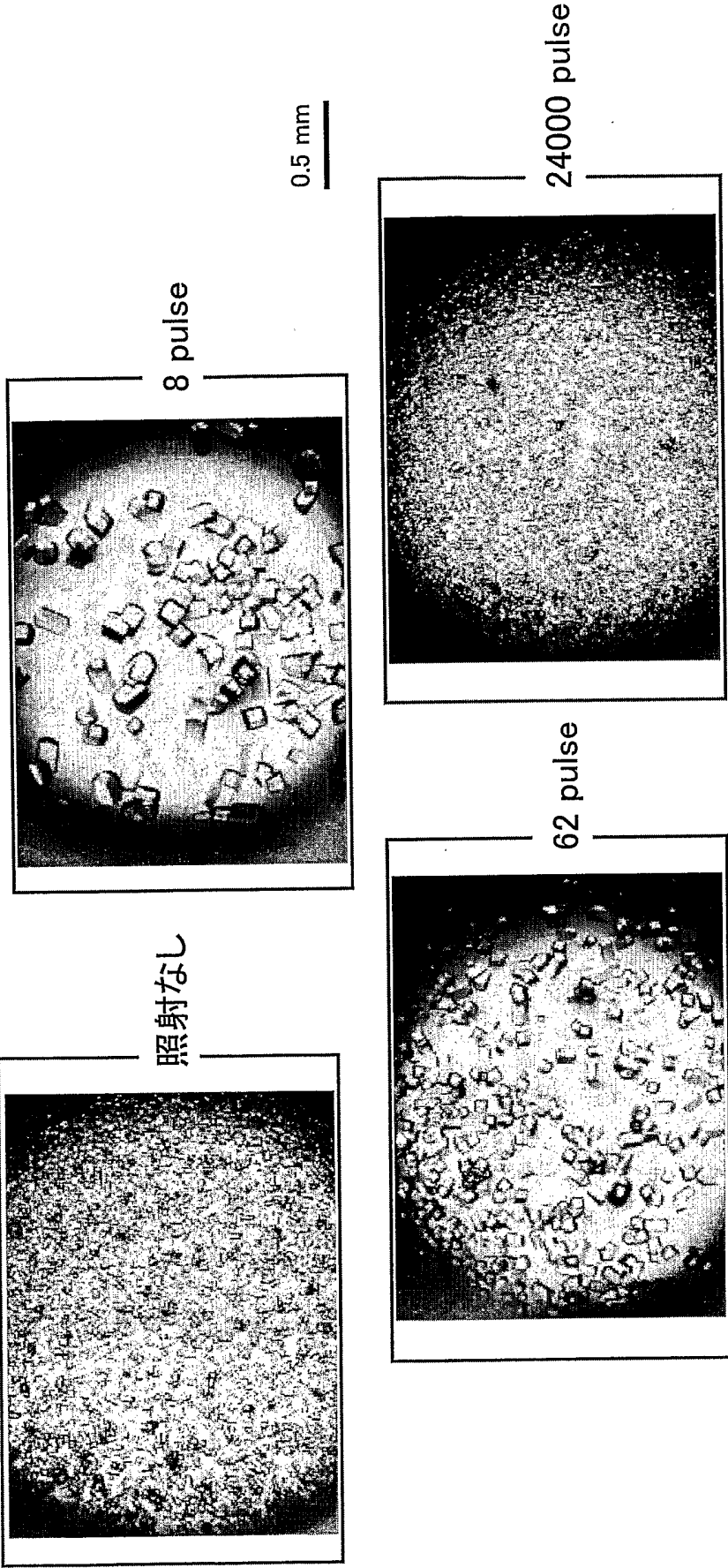


FIG.8

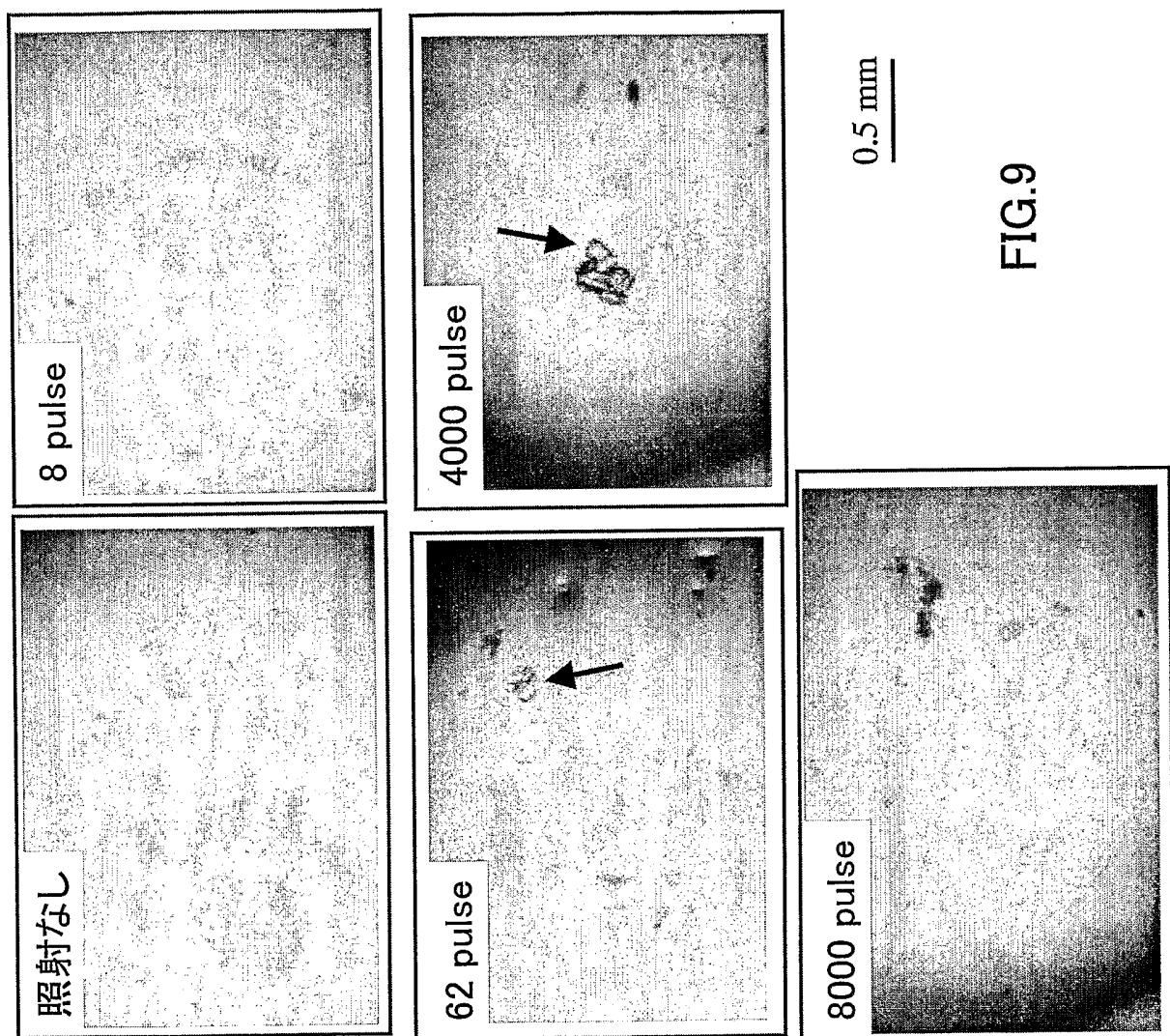


FIG.9

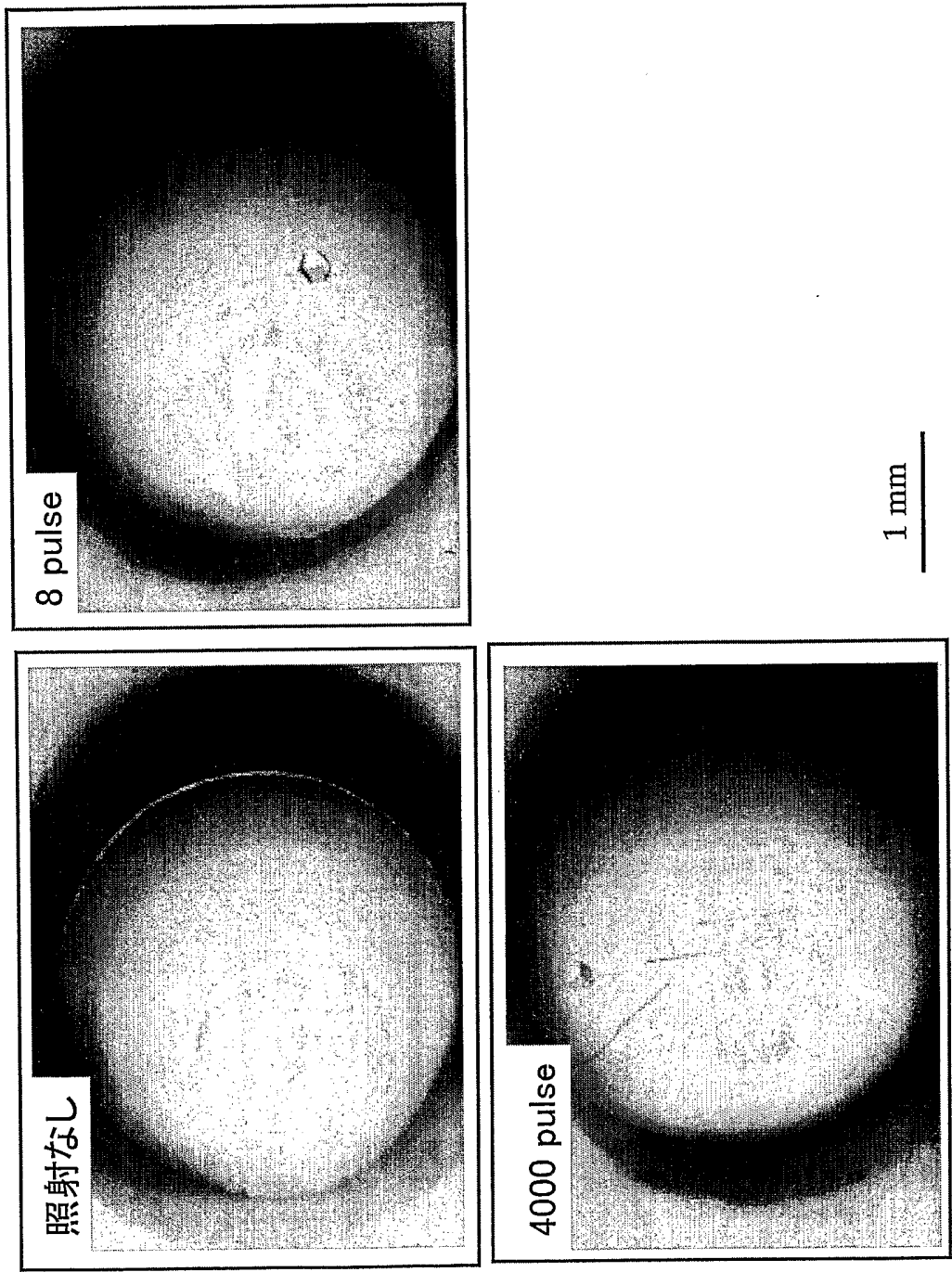
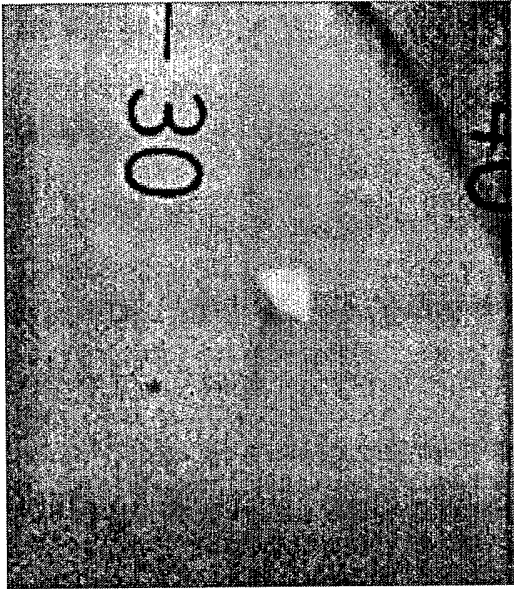


FIG.10



拡大

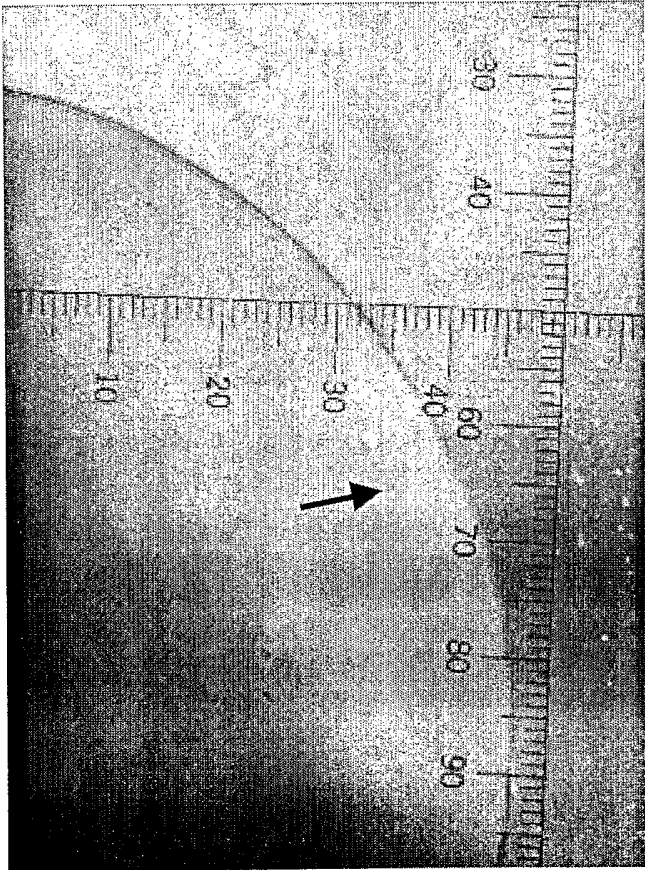


FIG.11

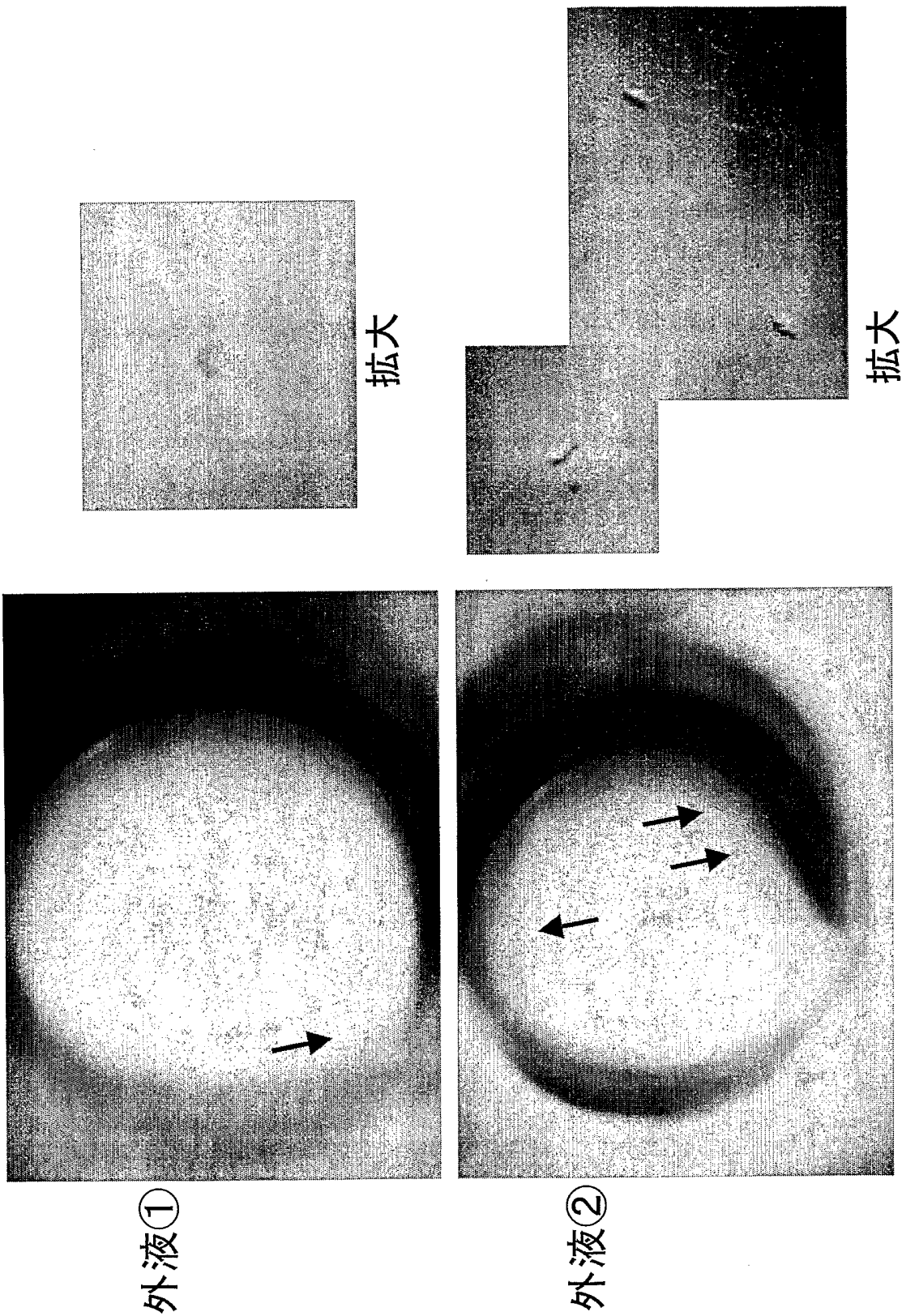


FIG.12

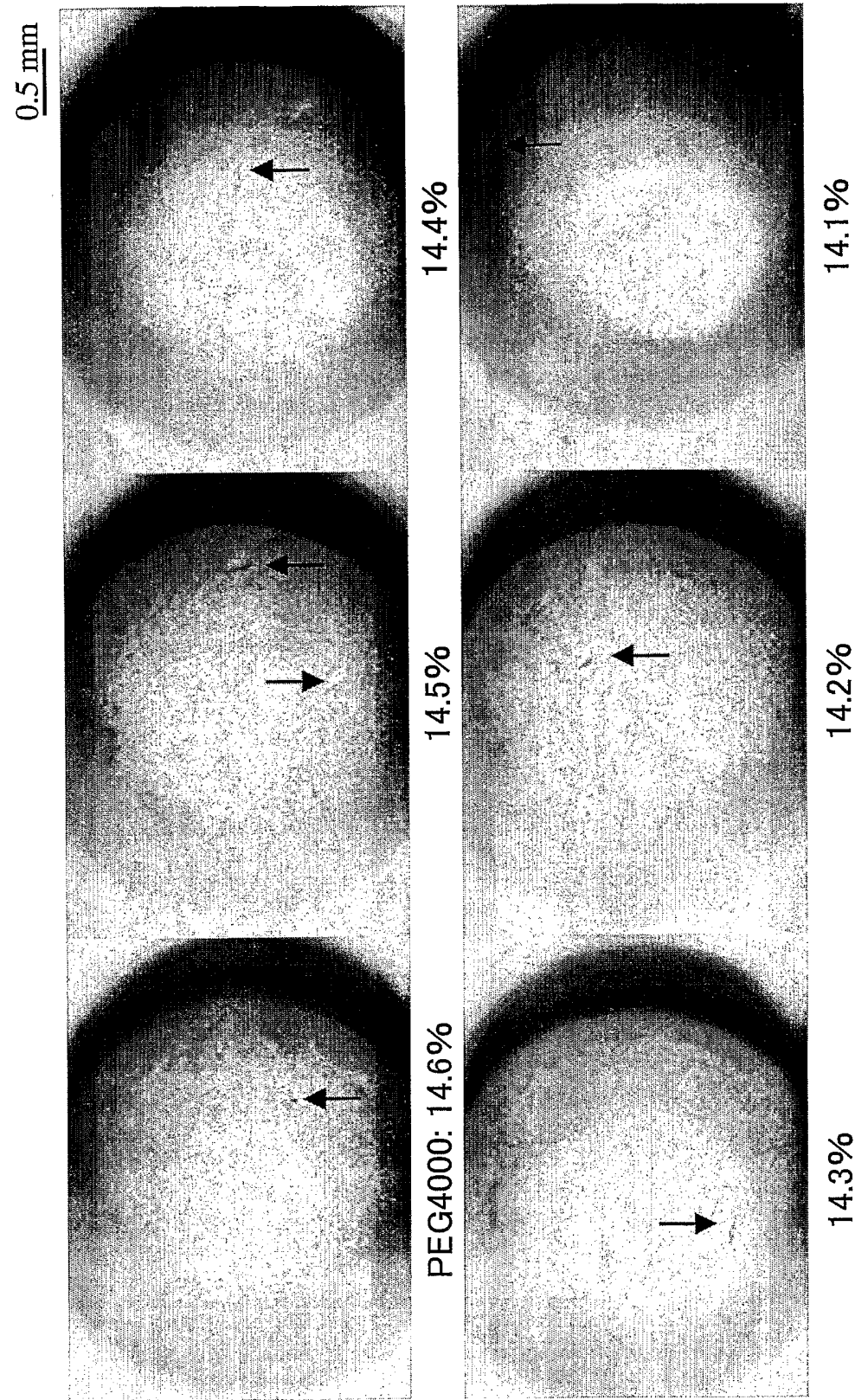


FIG.13

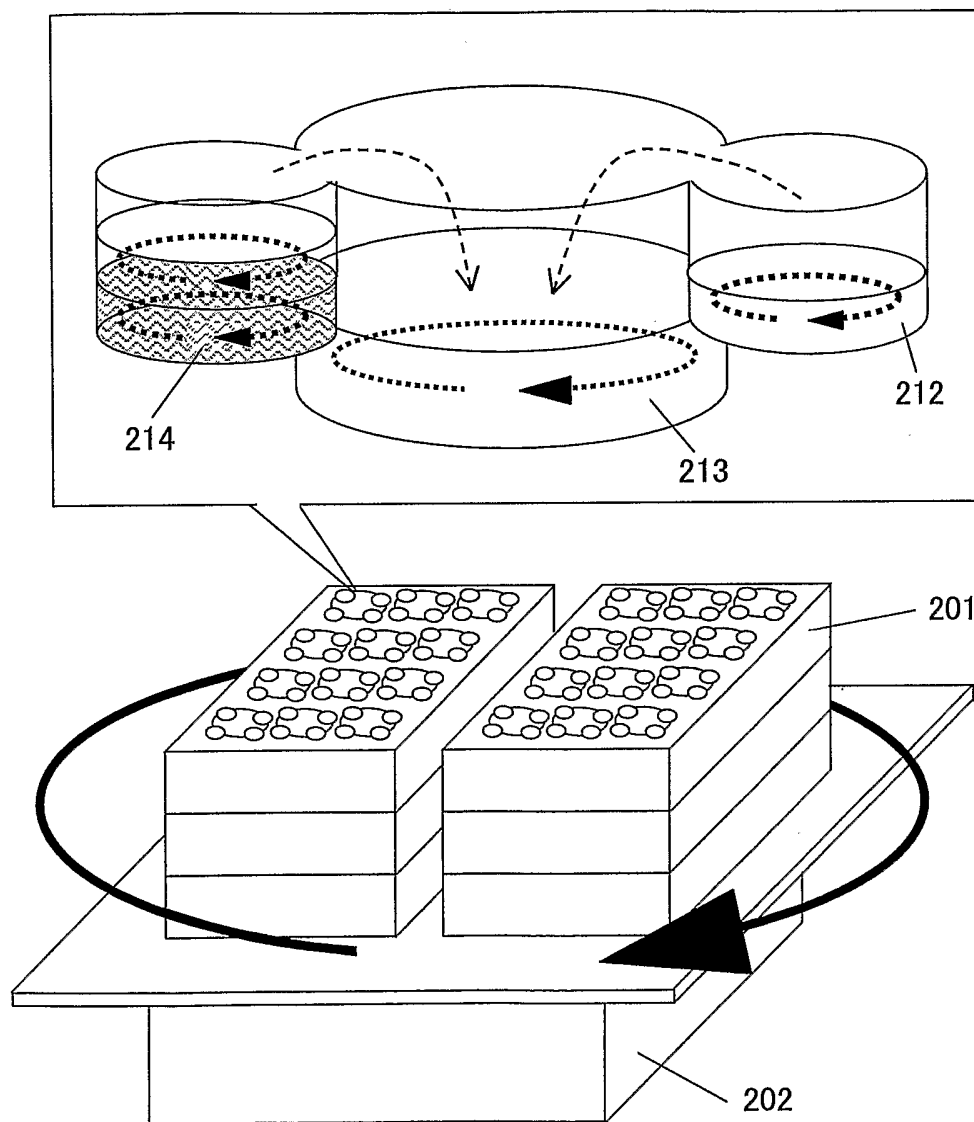


FIG.14

FIG.15A

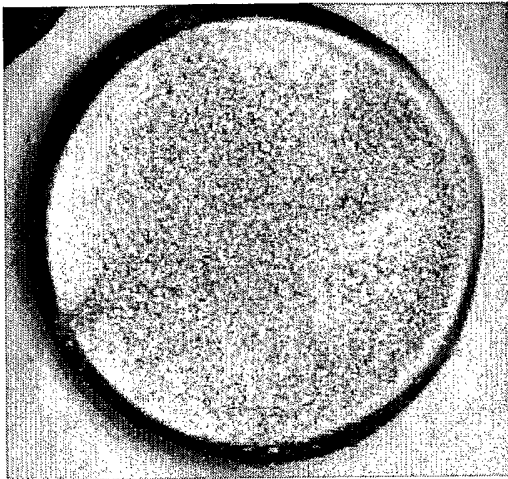


FIG.15B

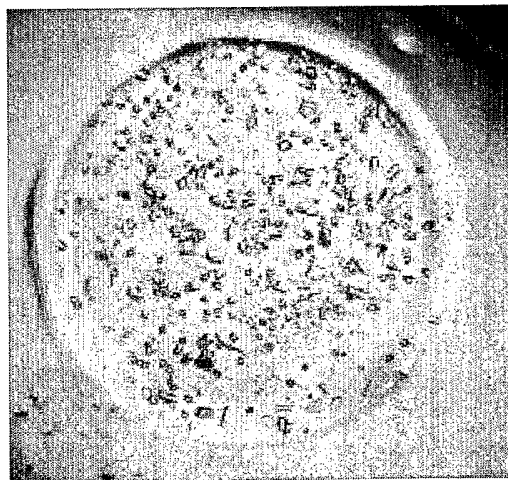
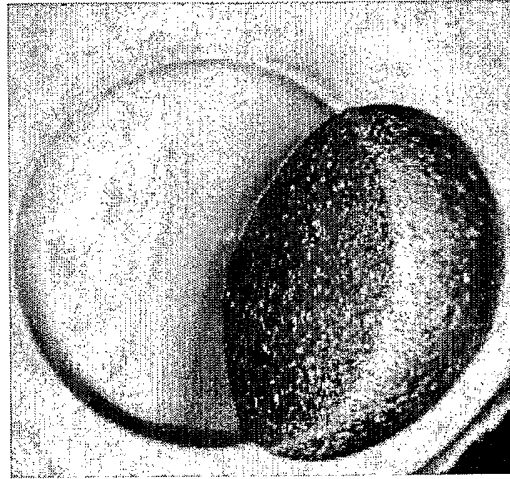


FIG.15C

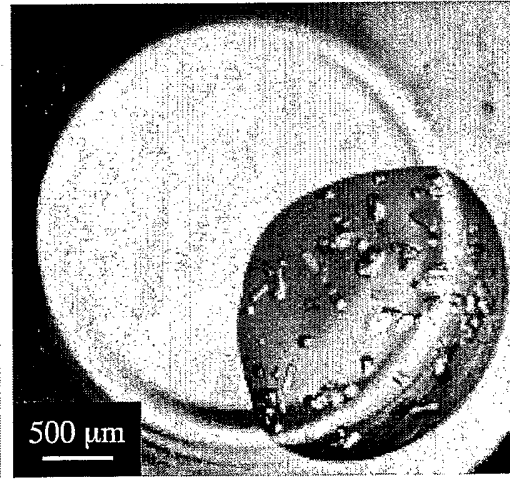


FIG.15D

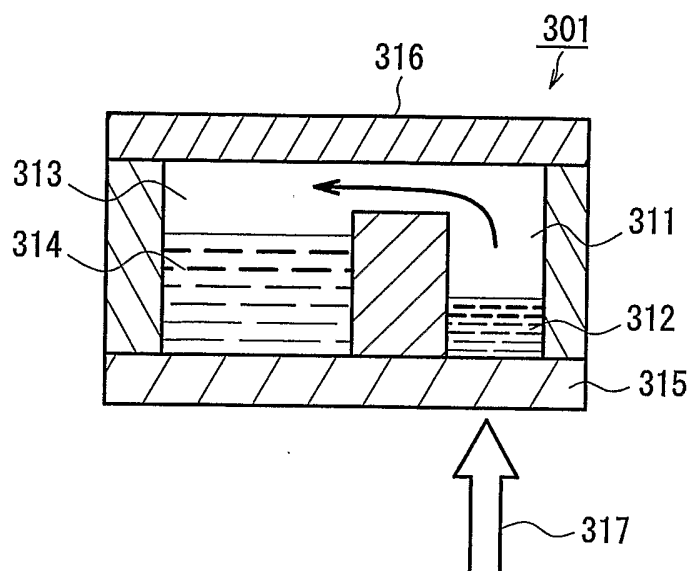


FIG. 16

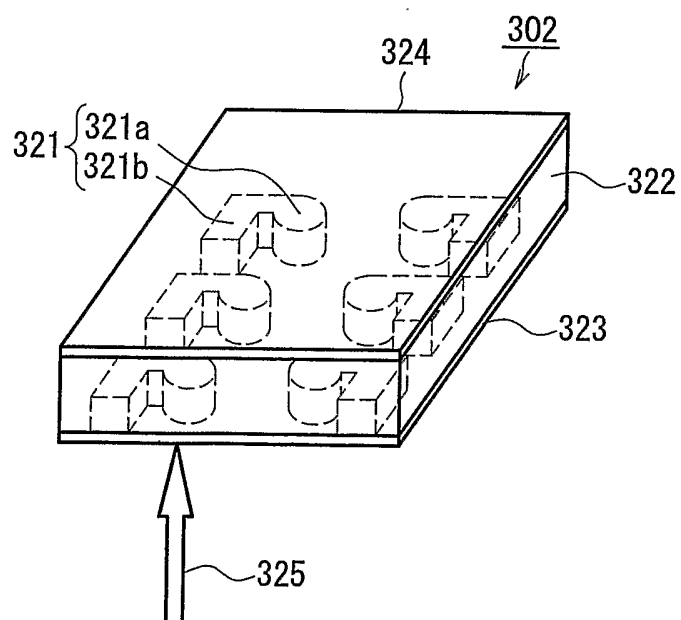


FIG. 17

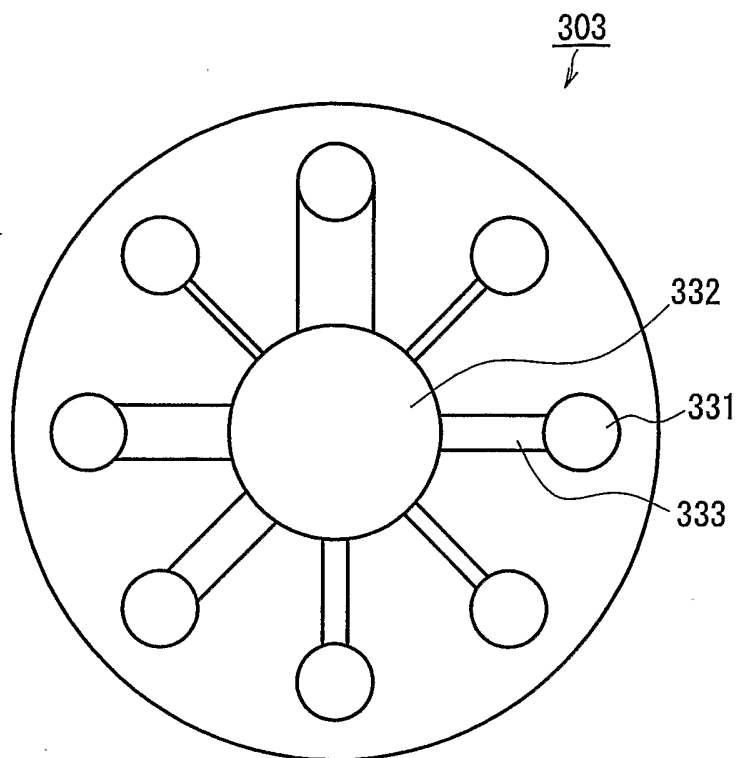


FIG. 18A

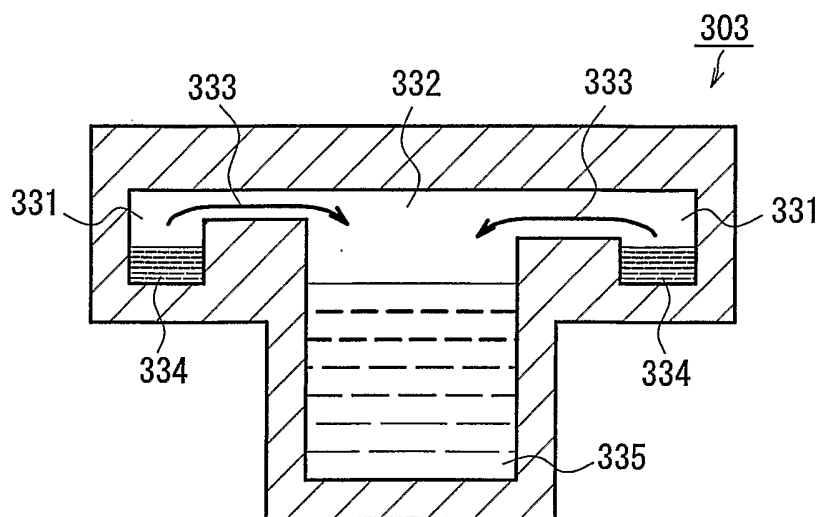


FIG. 18B

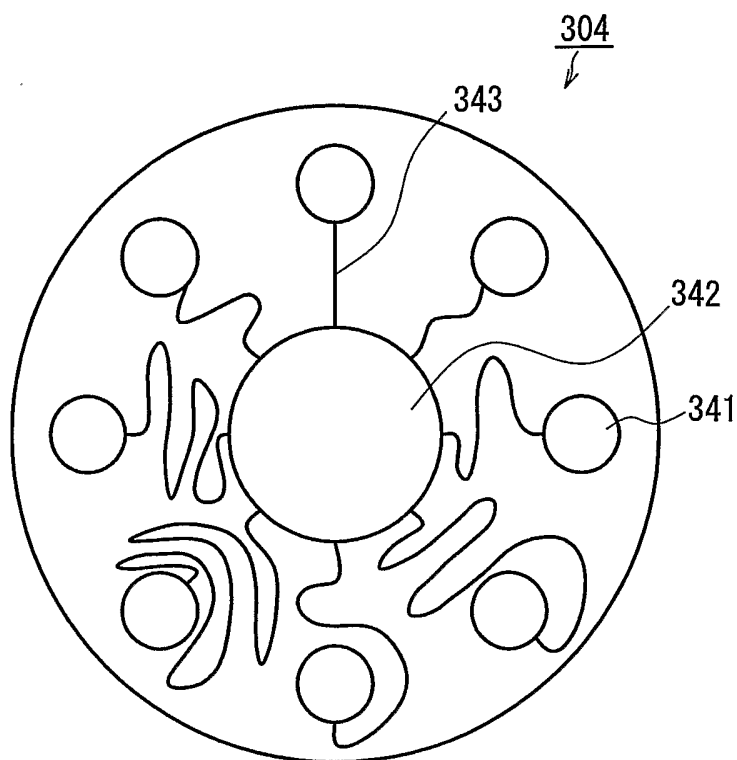


FIG. 19A

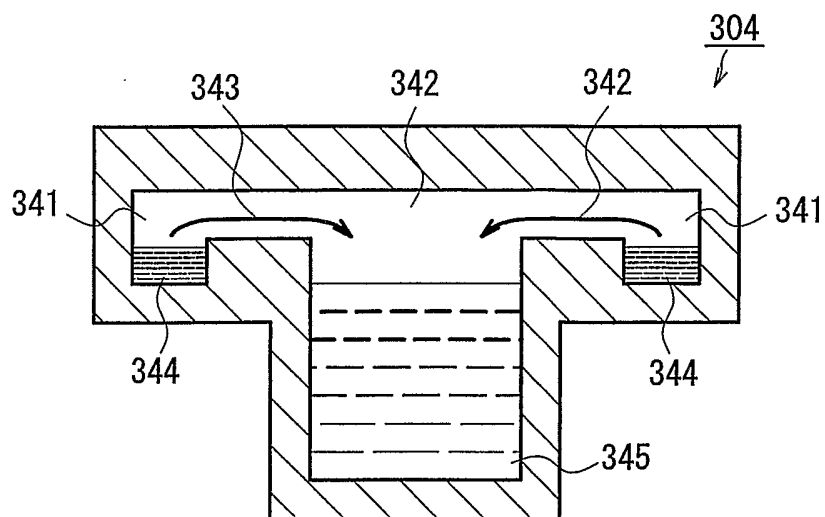


FIG. 19B

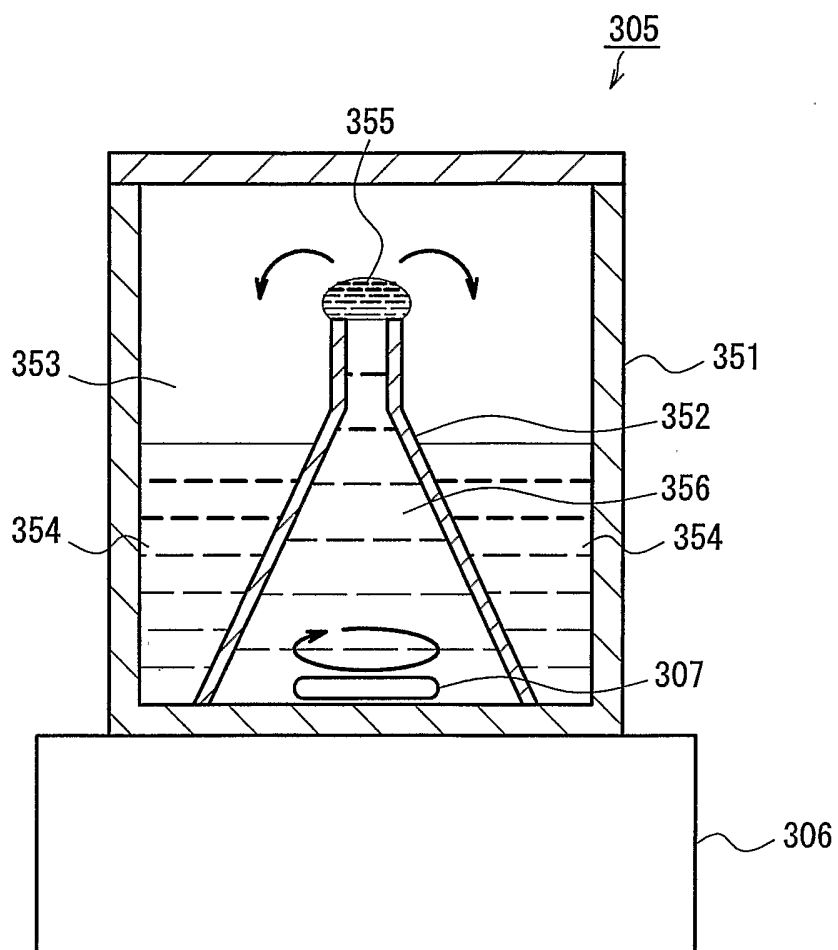


FIG. 20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10681

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C30B29/58, B01D9/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C30B1/00-35/00, B01D9/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2003 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2003 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2003 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI, JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 2002-68899 A (President of Osaka University),<br>08 March, 2002 (08.03.02),<br>(Family: none)                                          | 1-44                  |
| A         | Peter A. BANCEL et al., Laser seeding for<br>biomolecular crystallization., Journal of<br>Crystal Growth, 1998, Vol.191, pages 537 to 544 | 1-44                  |
| P,A       | JP 2003-306497 A (Tetsuo OKUTSU et al.),<br>28 October, 2003 (28.10.03),<br>(Family: none)                                                | 1-44                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
03 December, 2003 (03.12.03)

Date of mailing of the international search report  
16 December, 2003 (16.12.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl. <sup>7</sup> C30B29/58, B01D9/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> C30B1/00-35/00, B01D9/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-2003年  
日本国登録実用新案公報 1994-2003年  
日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CAS ONLINE, WPI, JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                           | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| A               | JP 2002-68899 A (大阪大学長) 2002.03.08 (ファミリーなし)                                                                                | 1-44             |
| A               | Peter A. BANCEL et al. Laser seeding for biomolecular crystallization. Journal of Crystal Growth, 1998, Vol.191, pp.537-544 | 1-44             |
| PA              | JP 2003-306497 A (奥津哲夫 外1名) 2003.10.28 (ファミリーなし)                                                                            | 1-44             |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.12.03

国際調査報告の発送日

16.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

横山 敏志

4G

2927

電話番号 03-3581-1101 内線 3416