

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年9月7日(07.09.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/159089 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 1/00 (2006.01) B01D 61/14 (2006.01)
B01D 9/02 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
B01D 61/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/046880

(22) 国際出願日: 2017年12月27日(27.12.2017)

(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 2017-039143 2017年3月2日(02.03.2017) JP

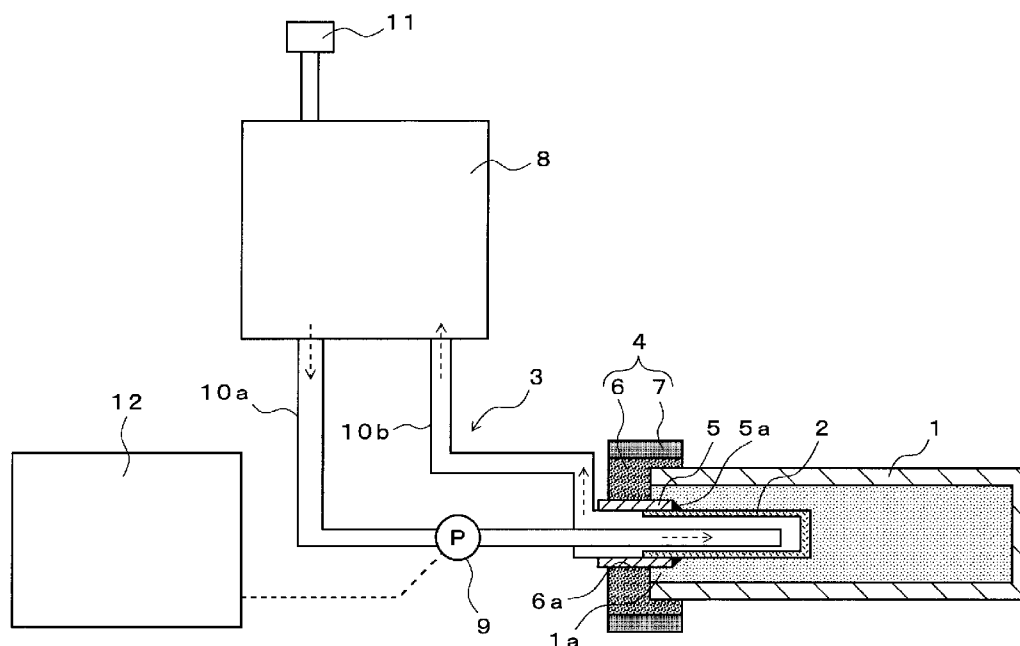
(71) 出願人: 千代田化工建設株式会社(CHIYODA CORPORATION) [JP/JP]; 〒2208765 神奈川県横浜市西区みなとみらい四丁目6番2

号 Kanagawa (JP). 株式会社コンフォーカルサイエンス(CONFOCAL SCIENCE INC.) [JP/JP]; 〒1580081 東京都世田谷区深沢5-14-15 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 谷川 直樹(TANIGAWA, Naoki); 〒2208765 神奈川県横浜市西区みなとみらい四丁目6番2号 千代田化工建設株式会社内 Kanagawa (JP). 田仲 広明(TANAKA, Hiroaki); 〒1580081 東京都世田谷区深沢5-14-15 株式会社コンフォーカルサイエンス内 Tokyo (JP). 高橋 幸子(TAKAHASHI, Sachiko); 〒1580081 東京都世田谷区深沢5-14-15 株式会社コンフォーカルサイエンス内 Tokyo (JP). 伊中 浩治(INAKA, Koji);

(54) Title: PROTEIN CRYSTALLIZATION METHOD AND CRYSTALLIZATION DEVICE

(54) 発明の名称: タンパク質の結晶化方法および結晶化装置



(57) Abstract: Provided are: an economically superior protein crystallization method that can efficiently identify conditions for crystallization using a small amount of a protein; and a crystallization device used in this method. According to the present invention, a part of a transparent sealed vessel 1 is formed of a molecular weight cut-off semipermeable membrane 2 that lets a precipitating agent pass through but blocks a protein. The transparent sealed vessel is filled with a solution of the protein, and then a precipitating agent solution, obtained by changing the concentration and/or pH of the

〒6391123 奈良県大和郡山市筒井 1 7 0 番 1
号 株式会社丸和栄養食品内 Nara (JP).

(74) 代理人:成瀬 重雄(NARUSE, Shigeo); 〒1040061
東京都中央区銀座8丁目16番10号 中銀本社
ビル3階 成瀬・清水特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

precipitating agent, is supplied to the semipermeable membrane 2 in a continuous manner so that the protein is crystallized by the precipitating agent that permeates into the sealed vessel 1 through the semipermeable membrane 2.

(57) 要約: 少量のタンパク質によって効率的に結晶化の条件を見出すことができ経済性にも優れるタンパク質の結晶化方法およびこれに用いられる結晶化装置を提供する。本発明によれば、沈澱剤を透過させるとともにタンパク質を透過させない分画分子量の半透膜2によって一部が形成された透明な密閉容器1内に上記タンパク質の溶液を充填し、次いで半透膜2に上記沈澱剤の濃度および/またはpHを変化させた沈澱剤溶液を連続的に供給して、半透膜2から密閉容器1内に浸透する上記沈澱剤によって上記タンパク質を結晶化させる。

明 細 書

発明の名称： タンパク質の結晶化方法および結晶化装置

技術分野

[0001] 本発明は、半透膜を間に介して濃度を変化させた沈澱剤溶液を連続的に供給することによりタンパク質を結晶化させるタンパク質の結晶化方法および結晶化装置に関するものである。

背景技術

[0002] 近年、例えば製薬業界等においては、タンパク質結合化合物の探索のため、また基礎研究ではタンパク質の機能と構造との関係を解明するために、上記タンパク質を結晶化し、X線回析や中性子回析などの手法により解析されてきた。

[0003] ところで、タンパク質を結晶化させるに際しては、一般的にタンパク質溶液に沈澱剤を添加させて溶液の溶解度を低下させ、タンパク質を析出させる方法が広く採用されている。しかしながら、タンパク質が結晶化する際の沈澱剤の濃度や反応時のpHは、タンパク質の種類によって異なる。

[0004] このため、従来からタンパク質の正確な結晶化条件を知るために、例えば下記特許文献1に見られるように、予め沈澱剤の濃度および／またはpHを変化させた多数の試料を用意し、網羅的にスクリーニングを実施して上記結晶化条件を把握する方法が広く採用されており、下記特許文献2に見られるように、そのための試薬キットも提案されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2006-281139号公報

特許文献2：特開2006-083126号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、上記スクリーニングによってタンパク質の結晶化条件を知

る方法にあっては、多数の試料によって網羅的にスクリーニングを行うために、多大の手間と時間を要するという問題点があった。加えて、貴重なタンパク質も多量に用意する必要が有るために、経済性にも劣るという問題点もあった。

[0007] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたもので、少量のタンパク質によって効率的に結晶化の条件を見出すことができ経済性にも優れるタンパク質の結晶化方法およびこれに用いられる結晶化装置を提供することを課題とするものである。

課題を解決するための手段

[0008] 上記課題を解決するため、請求項 1 に記載の本発明に係るタンパク質の結晶化方法は、沈澱剤を透過させるとともにタンパク質を透過させない分画分子量の半透膜によって一部が形成された透明な密閉容器内に上記タンパク質の溶液を充填し、次いで上記半透膜に上記沈澱剤の濃度および／または pH を変化させた沈澱剤溶液を連続的に供給して、上記半透膜から上記密閉容器内に浸透する上記沈澱剤によって上記タンパク質を結晶化させることを特徴とするものである。

[0009] また、請求項 2 に記載の発明は、請求項 1 に記載の発明において、上記密閉容器の上記半透膜と対向する位置に配置された水蒸気を通過させるとともに液体を通過させない分画分子量のガス透過膜に、乾燥空気または吸湿性を有する液体を連続的に供給することによって、上記密閉容器内に上記沈澱剤の濃度および／または pH、およびタンパク質濃度の勾配を形成させることを特徴とするものである。

[0010] また、請求項 3 に記載の発明は、請求項 1 または 2 に記載の発明において、上記密閉容器内に充填する上記溶液は、上記タンパク質に加えて、当該タンパク質が結晶化しない濃度の上記沈澱剤を含むことを特徴とするものである。

[0011] 請求項 4 に記載の発明は、タンパク質を含む溶液が充填される透明な密閉容器と、この密閉容器の一部を形成して沈澱剤を透過させるとともに上記タ

ンパク質を透過させない半透膜と、この半透膜に上記沈澱剤を含む沈澱剤溶液を循環供給する沈澱剤の供給手段とを備え、上記沈澱剤の供給手段は、上記沈澱剤溶液を貯留するリザーバと、このリザーバ内の上記沈澱剤溶液を上記半透膜に供給して再び上記リザーバに戻す循環ラインと、この循環ラインに介装されて上記沈澱剤溶液を連続的に上記半透膜に供給するポンプと、上記沈澱剤溶液の沈澱剤濃度を变化させる濃度調節手段とを有してなることを特徴とするものである。

[0012] また、請求項 5 に記載の発明は、請求項 4 に記載の発明において、上記密閉容器は、一端部が閉塞されて他端部に開口部が形成された管状部材であり、上記半透膜は開口部に筒状の細管が一体化された袋状に形成され、シール部材を介して上記密閉容器内に挿入されるとともに、上記シール部材は、中心部に上記密閉容器および上記細管の外径よりも小径の孔部が形成された円柱状の弾性部材と、この弾性部材の外径寸法よりも内径寸法が小さい円筒状の拘束管とを備え、上記弾性部材の上記孔部の一端部に上記密閉容器が嵌合されるとともに他端部に上記細管が嵌合され、圧縮された上記弾性部材が上記拘束管内に嵌合されてなることを特徴とするものである。

[0013] 請求項 6 に記載の発明は、請求項 4 または 5 に記載の発明において、上記密閉容器の上記半透膜と対向する位置に配置されて水蒸気を通過させるとともに液体を通過させない分画分子量のガス透過膜と、このガス透過膜に乾燥空気または吸湿性を有する液体を連続的に供給する第 2 の供給手段と、上記ガス透過膜を通じて上記密閉容器内から排出される水蒸気の排気手段とを備えることを特徴とするものである。

[0014] さらに、請求項 7 に記載の発明は、請求項 4 ～ 6 のいずれかに記載の発明において、上記密閉容器は、ガラスまたは石英からなることを特徴とするものである。

[0015] また、請求項 8 に記載の発明は、請求項 4 ～ 7 のいずれかに記載の発明において、上記弾性部材は、硬度が 15 度～25 度のシリコンゴムであることを特徴とするものである。なお、上記硬度は、JIS K 6253 に対応したデュ

ロメータによって測定されるものである。

発明の効果

- [0016] 請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の発明によれば、透明な密閉容器内に充填したタンパク質の溶液に対して、当該密閉容器の一部を形成する半透膜に、沈澱剤の濃度および／または pH を変化させた沈澱剤溶液を連続的に供給することにより、上記半透膜から密閉容器内に浸透する沈澱剤の濃度および／または pH を徐々に変えて上記タンパク質を結晶化させているために、タンパク質の濃度を変えることなく、当該タンパク質を結晶化させることができる。
- [0017] そして、上記密閉容器を透明にしているために、タンパク質の結晶化を外部から観察することにより、上記タンパク質の結晶化の事実と、結晶化した際の沈澱剤の濃度および／または pH とから、当該タンパク質が結晶化する際の沈澱剤の濃度および／または pH 条件を把握することができ、よって少量のタンパク質によって効率的に結晶化の条件を見出すことができる。
- [0018] なお、このようにしてタンパク質の結晶化条件を見出してタンパク質結晶を結晶化させるに際して、得られたタンパク質結晶を中性子回析や X 線回析によって解析する場合には、その結晶が大きいほど詳細に解析することができる。このため、上記タンパク質を 1 mm³ 以上の大型に結晶化させることが好ましい。
- [0019] ところが、一般にタンパク質が結晶化する際には、タンパク質溶液中の多数の箇所でも生成した結晶核を中心に周囲のタンパク質が均等に分配されて結晶化されるために、1 個当たりのタンパク質結晶を形成するタンパク質の量が少なく、この結果、従来から大型のタンパク質結晶を生成させることが難しいという問題点があった。
- [0020] これに対して、請求項 2 または 6 に記載の発明によれば、上記密閉容器の半透膜と対向する位置に配置したガス透過膜に、乾燥空気または吸湿性を有する液体を連続的に供給して密閉容器から水蒸気を排出させることにより、上記ガス透過膜側よりも半透膜側において上記沈澱剤の濃度および／または

pHが高くなる勾配を形成させるとともに、上記半透膜側よりもガス透過膜側において上記タンパク質濃度が高くなる勾配を形成させることによって密閉容器内に幅広い結晶化条件を作り出し、上記結晶核を1箇所～数箇所で生じさせて大きく成長させることにより、大型化したタンパク質結晶を生成させることが可能になる。

[0021] ちなみに、請求項3に記載の発明のように、密閉容器内に充填する溶液に、タンパク質に加えて、予め当該タンパク質が結晶化しない濃度の沈澱剤を添加しておけば、タンパク質が結晶化するまでの操作時間の短縮化も図ることが可能になる。

[0022] また、請求項4に記載のタンパク質の結晶化装置発明において、密閉容器の一部を半透膜によって形成する態様としては、請求項5に記載の発明のように、管状部材からなる密閉容器の開口部から袋状の半透膜を内部に挿入し、当該半透膜の開口部に一体化された細管と密閉容器との間を、拘束管によって弾性部材を圧縮したシール部材で封じる構成を採用することができる。

[0023] また、半透膜を介して密閉容器内の沈澱剤の濃度を変化させる際は、半透膜の両側の溶液の濃度差が大きくなると浸透圧が発生し、密閉容器内が減圧または加圧され、密閉容器内に空気が入ったり、あるいは内部の溶液の漏洩を生じたりする虞がある。例えば、半透膜内外で50mMの濃度差がある場合、その浸透圧は約1.2気圧に相当する。

[0024] この点、上述した請求項5に記載のシール部材によれば、弾性部材に密閉容器の開口端部および半透膜に一体化された細管を嵌合するとともに、上記弾性部材を拘束管によって圧縮しているために、当該弾性部材の反発力によって、弾性部材の孔部と密閉容器の開口端部および細管の外周との間、および弾性部材の外周と拘束管との間を密閉することにより、密閉容器内との間に発生する浸透圧差に耐えられる高い密閉強度を得ることができる。

[0025] この際に、上記密閉容器としては、内部への水蒸気等の気体の透過を抑制するために、請求項7に記載の発明のように、ガラスまたは石英を用いることが好ましい。

[0026] また、上記シール部材を構成する弾性体としては、請求項 8 に記載の発明のような硬度が 15 度～25 度のシリコンゴムが好適である。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]図 1 は、本発明に係るタンパク質の結晶化装置の第 1 の実施形態を示す概略構成図である。

[図2]図 2 は、本発明に係るタンパク質の結晶化装置の第 2 の実施形態を示す概略構成図である。

発明を実施するための形態

[0028] (第 1 の実施形態)

図 1 は、本発明に係るタンパク質の結晶化装置の第 1 の実施形態を示すもので、このタンパク質の結晶化装置は、タンパク質を含む溶液が充填される透明な密閉容器 1 と、この密閉容器 1 の内部に挿入された半透膜 2 と、この半透膜 2 に沈澱剤を含む沈澱剤溶液を循環供給する沈澱剤の供給手段 3 とから概略構成されたものである。

[0029] 密閉容器 1 は、一端部が閉塞されて他端部に開口部 1 a が形成されたガラスまたは石英からなる透明な管状部材であり、例えば内径寸法が 0.4～4mm で長さ寸法が 10～30mm に形成されている。そして、この密閉容器 1 内に半透膜 2 が挿入されるとともに、開口部 1 a がシール部材 4 によって気密的に封じられている。

[0030] ここで、半透膜 2 は、分画分子量が 2,000～100,000Da の範囲であって、かつ上記沈澱剤を透過させるとともに上記タンパク質を透過させない素材からなる袋状のもので、例えば外径寸法が 0.2～0.4mm の細長い袋状に形成されている。

[0031] ちなみに、上記半透膜 2 としては、キュブラアンモニウムレーヨン(C R)や鹼化セルロース(S C A)等の再生セルロース膜(R C)、ヘモファン膜、P C 膜、ビタミン E コーティング膜等の表面改質再生セルロース膜、セルロースジアセテート(C D A)やセルローストリアセテート(C T A)等のセルロースアセテート(C A)、ポリアクリロニトリール(P A N)、ポリメチルメタクリ

レート(PMMA)、エチレンビニルアルコール共重合体(EVAL)、ポリスルホン(PS)、ポアミド(PA)、ポリエステル系ポリマーアロイ(PEPA)等の合成高分子系膜を用いることができる。

[0032] また、この半透膜2の開口部には、筒状の細管5が一体化されている。具体的には、半透膜2の開口部周辺が細管5内に挿入され、接着剤5aによって両者が一体化されている。なお、上記細管5としては、金属管、プラスチック管、ガラス管または石英管等を用いることができる。

[0033] そして、この半透膜2は、その全長および細管5の一部が密閉容器1内に挿入されるとともに、密閉容器1から突出する細管5の外周および密閉容器1の開口端部の外周に、密閉容器1内を密に封じる上記シール部材4が設けられている。

[0034] このシール部材4は、中心部に密閉容器1および細管5の外径よりも小径の孔部6aが形成された円柱状のシリコーンゴム（弾性部材）6と、このシリコーンゴム6の外径寸法よりも内径寸法が小さい円筒状の金属からなる拘束管7とから構成されている。

[0035] この拘束管7は、内径寸法が4.5～4.9mm、長さ寸法が8～12mmに形成されている。そして、シリコーンゴム6は、硬度が15度～25度であって、拘束管7の内径を1としたときに外径が1.1～1.9の範囲、具体的には外径寸法が5～6mmであって、長さ寸法が6～10mmに形成されている。

[0036] このシール部材4によって密閉容器1の開口部1aを封じるには、先ずシリコーンゴム6を圧縮して拘束管7内に嵌合した後に、シリコーンゴム6の孔部6aを押し広げて密閉容器1の開口端部を挿入して嵌合し、次いでシリコーンゴム6の他端部側から孔部6aを押し広げて、先端に半透膜2を有する細管5を貫通させ、半透膜2を密閉容器1内に配置するとともに、細管5をシリコーンゴム6内に3～7mm押し込む。

[0037] これにより、密閉容器1の開口部1aおよび細管5の外周がシリコーンゴム6によって密閉されるとともに、シリコーンゴム6の外周と拘束管7との間が密閉される。

[0038] そして、細管 5 に、半透膜 2 内に沈澱剤溶液を循環供給する沈澱剤の供給手段 3 が接続されている。

この供給手段 3 は、沈澱剤溶液を貯留するリザーバ 8 と、このリザーバ 8 内の上記沈澱剤溶液をポンプ 9 によって半透膜 2 内に供給するチューブ 10 a およびこの半透膜 2 内の上記沈澱剤溶液をリザーバ 8 内に戻すチューブ 10 b からなる循環ライン 10 と、リザーバ 8 の上部に設けられて濃度の異なる沈澱剤溶液をリザーバ 8 内に供給することにより上記沈澱剤溶液の沈澱剤濃度を変化させるポート（濃度調節手段） 11 とから構成されたものである。

[0039] ここで、リザーバ 8 は、その容量が密閉容器 1 の容量に対して小さいと、タンパク質溶液中の沈澱剤濃度によってリザーバ 8 内の沈澱剤の濃度および／または pH に影響を与えることになり、濃度が安定しなくなることから、密閉容器 1 の容積の 100 倍以上であることが好ましく、本実施形態においては、取り扱いの観点も考慮して 1～50mL の容量に設定されている。なお、図中符号 12 は、ポンプ 9 を駆動制御するための電源設備である。

[0040] 次に、以上の構成からなるタンパク質の結晶化装置を用いた本発明に係るタンパク質の結晶化方法の第 1 の実施形態について説明する。

予め密閉容器 1 内に所定濃度のタンパク質溶液を充填してシール部材 4 によって開口部 1 a を密閉するとともに、リザーバ 8 内に貯留した所定の濃度に調整した沈澱剤溶液を、ポンプ 9 によってチューブ 10 a から半透膜 2 内を介してチューブ 10 b からリザーバ 8 へと連続的に循環させる。

[0041] ここで、沈澱剤としては、タンパク質を変性させることなく凝縮させることができる塩あるいは高分子であればよく、一般的には塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコールなどを用いることができる。

[0042] 上記沈澱剤溶液を連続的に循環供給すると、半透膜 2 は、上記沈澱剤は透過させるが、タンパク質は透過させない素材によって形成されているために、沈澱剤が半透膜 2 から密閉容器 1 内へと浸透する。そこで、ポート 11 から漸次濃度が高い沈澱剤溶液をリザーバ 8 内に供給しつつ、上述した半透膜

2 への循環供給を行うと、密閉容器 1 内の沈澱剤濃度が所定の濃度に達した際に、タンパク質が結晶化する。

[0043] そして、透明な密閉容器 1 の外側から上記結晶化を観察するとともに、その際の沈澱剤の濃度および／または pH を確認することにより、上記タンパク質の結晶化条件を把握することができる。

[0044] 以上のように、上記タンパク質の結晶化装置およびこれを用いた結晶化方法によれば、透明な密閉容器 1 内に充填したタンパク質の溶液に対して、シール部材 4 を介して密閉容器 1 に配置した半透膜 2 に、沈澱剤の濃度および／または pH を変化させた沈澱剤溶液を連続的に供給することにより、半透膜 2 から密閉容器 1 内に浸透する沈澱剤の濃度および／または pH を徐々に変えて上記タンパク質を結晶化させているために、タンパク質の濃度を変えることなく、当該タンパク質を結晶化させることができる。

[0045] この際に、密閉容器 1 を透明にしているために、タンパク質の結晶化を外部から観察することにより、上記タンパク質の結晶化の事実と、結晶化した際の沈澱剤の濃度および／または pH とから、当該タンパク質が結晶化する際の沈澱剤の濃度および／または pH 条件を把握することができ、よって少量のタンパク質によって効率的に結晶化の条件を見出すことができる。また、密閉容器 1 にガラス管または石英管を用いることにより、生成したタンパク質を分析容器に移し替えることなく X 線回析もしくは中性子回析にそのまま供することが可能になる。

[0046] 加えて、シリコーンゴム 6 の孔部 6 a に密閉容器 1 の開口端部および半透膜 2 に一体化された細管 5 を嵌合するとともに、シリコーンゴム 6 を拘束管 7 によって圧縮しているために、シリコーンゴム 6 の反発力によって、シリコーンゴム 6 の孔部 6 a と密閉容器 1 の開口端部および細管 5 の外周との間、およびシリコーンゴム 6 の外周と拘束管 7 との間を密閉することにより、密閉容器 1 内との間に発生する浸透圧差に耐えられる高い密閉強度を得ることができる。

[0047] なお、上記実施形態においては、密閉容器 1 内にタンパク質の溶液を充填

した場合についてのみ説明したが、本発明はこれに限定されるものではなく、密閉容器 1 内に上記タンパク質に加えて当該タンパク質が結晶化しない濃度の上記沈澱剤を含む溶液を充填することもできる。

[0048] このように、予め一定量の沈澱剤を加えておくことにより、タンパク質の濃度を変えることなく、タンパク質が結晶化するまでの操作時間の短縮化も図ることが可能になる。

[0049] (第 2 の実施形態)

図 2 は、本発明に係るタンパク質の結晶化装置の第 2 の実施形態を示すもので、図 1 に示した第 1 の実施形態と同一構成部分については、同一符号を付して、その説明を簡略化させる。

[0050] この結晶化装置においては、密閉容器 1 の半透膜 2 と対向する他端部に開口部 1 b が形成されるとともに、この開口部 1 b に同様のシリコンゴム 6 および拘束管 7 からなるシール部材 4 が設けられ、このシリコンゴム 6 の孔部 6 a に挿通された細管 5 の先端に、密閉容器 1 内に延出するガス透過膜 20 が設けられている。

[0051] このガス透過膜 20 は、水蒸気を通過させるとともに液体を通過させない分画分子量の素材によって形成された細長い袋状のもので、例えば外径寸法が 0.2~0.4mm に形成されている。

[0052] ちなみに、上記ガス透過膜 20 としては、上述した半透膜 2 の表面に、例えば JIS K 7129:2008 記載の赤外センサ法により測定した結果、25℃、90% 相対湿度環境で厚さ 25 μ m の試料を用いて水蒸気透過度が 100g/m²・24h 以上ある液状の RTV (室温硬化型) シリコンゴム、PDMS (ポリジメチルシロキサン) シリコンゴム、あるいはポリウレタンを塗布したものをを用いることができる。

[0053] あるいは、フィルム状のシリコンゴム、ナイロン (登録商標) 6、ポリスチレン、ポリウレタンなどの素材によって上記寸法の細長い袋状に形成したものをを用いることもできる、

[0054] そして、このガス透過膜 20 が設けられた細管 5 内に、ガス透過膜 20 内

に乾燥空気または吸湿性を有する液体を連続的に供給する供給管 21、フィルタ 22 およびポンプ 23 からなる第 2 の供給手段 24 と、ガス透過膜 20 を通じて密閉容器 1 内から排出される水蒸気を細管 5 内から排出する排気管（排気手段） 25 とが設けられている。

[0055] 次に、以上の構成からなるタンパク質の結晶化装置を用いた本発明に係るタンパク質の結晶化方法の第 2 の実施形態について説明する。

まず、第 1 の実施形態と同様に、ポート 11 から漸次濃度が高い沈澱剤溶液をリザーバ 8 内に供給しつつ、半透膜 2 への循環供給を行う。

[0056] これと併行して、密閉容器 1 の半透膜 2 と対向する他端部 1b に配置したガス透過膜 20 に供給管 21 から乾燥空気または吸湿性を有する液体を連続的に供給して密閉容器 1 内から水蒸気を排出させる。

[0057] これにより、密閉容器 1 内においては沈澱剤の濃度および／または pH がガス透過膜 20 側よりも半透膜 2 側において高くなるとともに、タンパク質濃度が半透膜 2 側よりもガス透過膜 20 側において高くなる勾配が形成される。この結果、密閉容器 1 内の沈澱剤濃度が所定の濃度に達した際に、上記結晶核が 1 箇所～数箇所まで成長して大きなタンパク質の結晶が生成される。

[0058] 以上のように、上記タンパク質の結晶化装置およびこれを用いた結晶化方法によれば、第 1 の実施形態と同様に、透明な密閉容器 1 の外側から上記結晶化を観察するとともに、その際の沈澱剤の濃度および／または pH を確認することにより、上記タンパク質の結晶化条件を概ね把握することができる。とともに、さらに密閉容器 1 内に大型のタンパク質結晶を生成させることができる。

実施例

[0059] （実施例 1）

上述したシール部材の密閉強度を検証するために、以下の実験を行った。

まず、外径 6mm、長さ 8mm のシリコーンゴムを、内径 4.7mm 長さ 10mm の拘束管の中に押し込み、外径 0.24mm で先端部に長さ 1mm の半透膜に一体化された細管をシリコーンゴム内に貫通させ、細管とシリコーンゴムの間をシールし、さ

らに半透膜を内径0.4mm、外径1.2mmのガラス管（密閉容器に対応）内に挿し込み、このガラス管をシリコンゴム内に5mm挿し込んでガラス管とシリコンゴム間をシールした。

[0060] そして、ガラス管のもう一方の端に圧力計とシリンジを取り付け、シリンジにより加圧したところ、本シール部材が250kPaの耐圧性を持つことを確認した。これは本シール部材が、約100mMまでの濃度差に耐えられることを示す。

[0061] （実施例2）

次いで、本発明に係るタンパク質の結晶化方法の実効性を検証するために、以下の実験を行った。

内径1.6mm、長さ15mm、容積30 μ Lのガラス管（密閉容器に対応）内に、31.29mg/mLリゾチーム、50mM酢酸ナトリウム水溶液（pH4.5）を充填し、外径0.24mm、長さ1mmの半透膜および細管を備えた半透膜プローブ（6,000Daカットオフ）を挿入し、シリコンゴムでシールした後に、リザーバ内に5mLの50mM酢酸ナトリウム（pH4.5）、0.04%アジ化ナトリウム水溶液を充填し、60 μ L/minの流量でポンプを動作させた。

[0062] 次いで、これを1日放置した後に、リザーバ内に50mM酢酸ナトリウム、2,000mM塩化ナトリウム、0.04%アジ化ナトリウム水溶液を、シリンジポンプを用いて0.62 μ L/minの流量で徐々に添加し、結晶の有無を毎日観察した。その結果、リザーバ内の塩化ナトリウムの濃度を700mMまで上げたときに、ガラス管内に最大0.5mm角でX線回折に使用可能なリゾチーム結晶が確認された。

[0063] （実施例3）

上述した第2の実施形態に係るタンパク質の結晶化方法の実効性を検証するために、以下の実験を行った。

内径1.6mm、長さ15mm、容積30 μ Lのガラス管（密閉容器に対応）内に、50mMリゾチーム、50mM酢酸ナトリウム水溶液（pH4.5）、5%PEG4000水溶液を充填し、外径0.24mm、長さ1mmの半透膜および細管を備えた半透膜プローブ（6,000Daカットオフ）を挿入し、シリコンゴムでシールするとともに、他端部側

から上記半透膜の外側にRTVシリコンを塗布したガス透過膜プローブを挿入し、シリコンゴムでシールした。

[0064] 次いで、リザーバ内に5mLの50mM酢酸ナトリウム（pH4.5）、5%PEG4000水溶液を充填し、 $0.2\mu\text{L}/\text{min}$ の流量でポンプを動作させ、1日放置した後に、シリンジポンプを用いて、リザーバ内に50mM酢酸ナトリウム、2,000mM塩化ナトリウム、5%PEG4000水溶液を $0.2\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で徐々に添加するとともに、RTVシリコンを塗布したガス透過膜プローブ内に $0.5\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で空気の送り込みを開始し、4日間放置して塩化ナトリウム濃度を0.4Mとし、次いで $0.4\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で3.75mL追加した。

[0065] その結果、ガラス管内に結晶が合計3個発生し、最大1.8mm角のリゾチーム結晶が得られた。そこで、X線回析を行い、その分解能および配向性を測定したところ、良質な結晶であることを確認した。

産業上の利用可能性

[0066] 本発明は、少量のタンパク質によって効率的に結晶化の条件を見出すことができ、経済性にも優れるタンパク質の結晶化方法およびこれに用いられる結晶化装置を提供することができる。

符号の説明

- [0067]
- 1 密閉容器
 - 2 半透膜
 - 3 沈澱剤の供給手段
 - 4 シール部材
 - 5 細管
 - 6 シリコンゴム（弾性部材）
 - 7 拘束管
 - 8 リザーバ
 - 9 ポンプ
 - 11 ポート（濃度調節手段）
 - 20 ガス透過膜

2 4 第 2 の供給手段

2 5 排気管（排気手段）

請求の範囲

- [請求項1] 沈澱剤を透過させるとともにタンパク質を透過させない分画分子量の半透膜によって一部が形成された透明な密閉容器内に上記タンパク質の溶液を充填し、次いで上記半透膜に上記沈澱剤の濃度および／またはpHを変化させた沈澱剤溶液を連続的に供給して、上記半透膜から上記密閉容器内に浸透する上記沈澱剤によって上記タンパク質を結晶化させることを特徴とするタンパク質の結晶化方法。
- [請求項2] 上記密閉容器の上記半透膜と対向する位置に配置された水蒸気を通過させるとともに液体を通過させない分画分子量のガス透過膜に、乾燥空気または吸湿性を有する液体を連続的に供給することによって、上記密閉容器内に上記沈澱剤の濃度および／またはpH、およびタンパク質濃度の勾配を形成させることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質の結晶化方法。
- [請求項3] 上記密閉容器内に充填する上記溶液は、上記タンパク質に加えて、当該タンパク質が結晶化しない濃度の上記沈澱剤を含むことを特徴とする請求項1または2に記載のタンパク質の結晶化方法。
- [請求項4] タンパク質を含む溶液が充填される透明な密閉容器と、この密閉容器の一部を形成して沈澱剤を透過させるとともに上記タンパク質を透過させない半透膜と、この半透膜に上記沈澱剤を含む沈澱剤溶液を循環供給する沈澱剤の供給手段とを備え、上記沈澱剤の供給手段は、上記沈澱剤溶液を貯留するリザーバと、このリザーバ内の上記沈澱剤溶液を上記半透膜に供給して再び上記リザーバに戻す循環ラインと、この循環ラインに介装されて上記沈澱剤溶液を連続的に上記半透膜に供給するポンプと、上記沈澱剤溶液の沈澱剤濃度を変化させる濃度調節手段とを有してなることを特徴とするタンパク質の結晶化装置。
- [請求項5] 上記密閉容器は、一端部が閉塞されて他端部に開口部が形成された管状部材であり、上記半透膜は開口部に筒状の細管が一体化された袋状に形成され、シール部材を介して上記密閉容器内に挿入されるとと

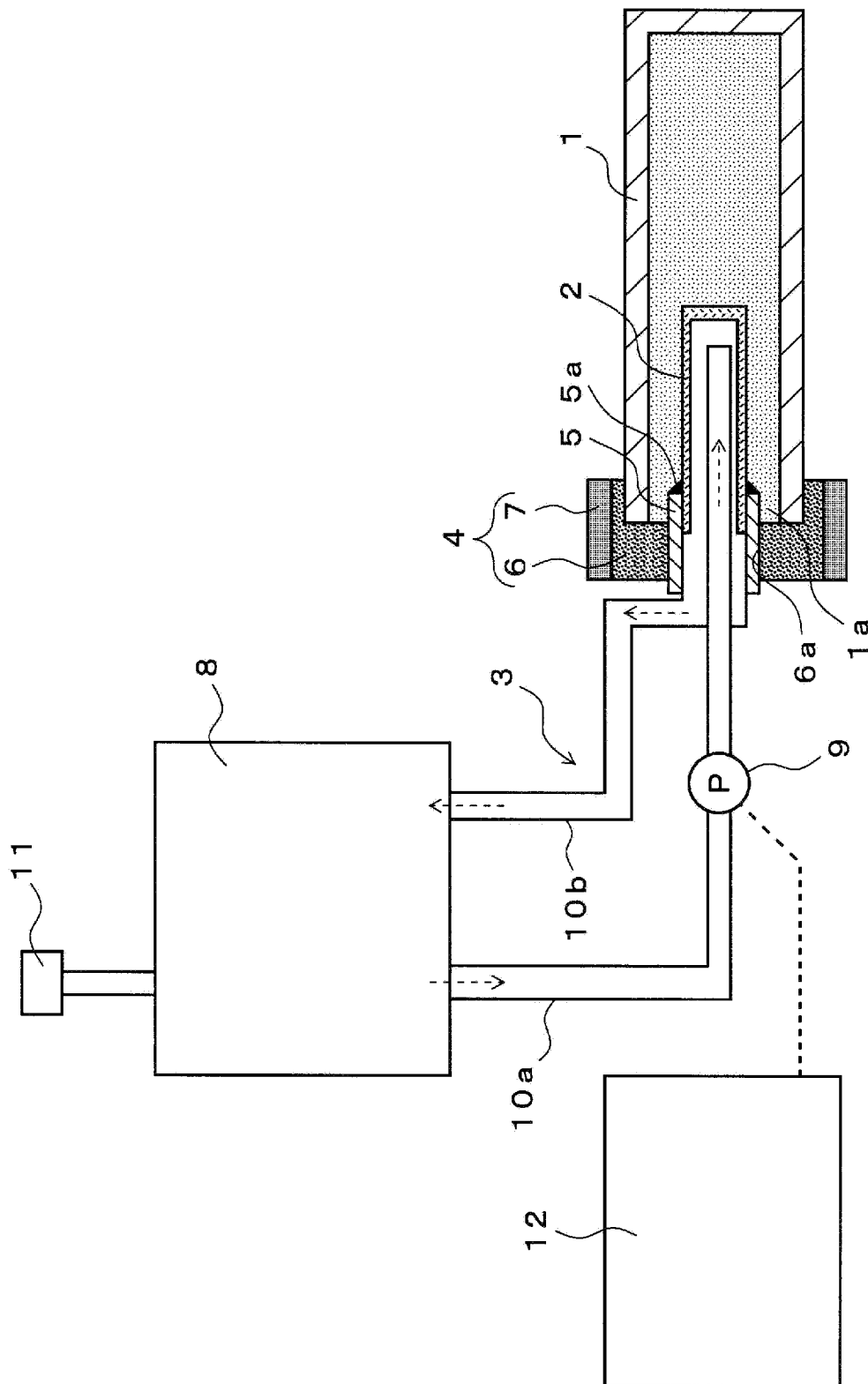
もに、上記シール部材は、中心部に上記密閉容器および上記細管の外径よりも小径の孔部が形成された円柱状の弾性部材と、この弾性部材の外径寸法よりも内径寸法が小さい円筒状の拘束管とを備え、上記弾性部材の上記孔部の一端部に上記密閉容器が嵌合されるとともに他端部に上記細管が嵌合され、圧縮された上記弾性部材が上記拘束管内に嵌合されてなることを特徴とする請求項4に記載のタンパク質の結晶化装置。

[請求項6] 上記密閉容器の上記半透膜と対向する位置に配置されて水蒸気を通過させるとともに液体を通過させない分画分子量のガス透過膜と、このガス透過膜に乾燥空気または吸湿性を有する液体を連続的に供給する第2の供給手段と、上記ガス透過膜を通じて上記密閉容器内から排出される水蒸気の排気手段とを備えることを特徴とする請求項4または5に記載のタンパク質の結晶化装置。

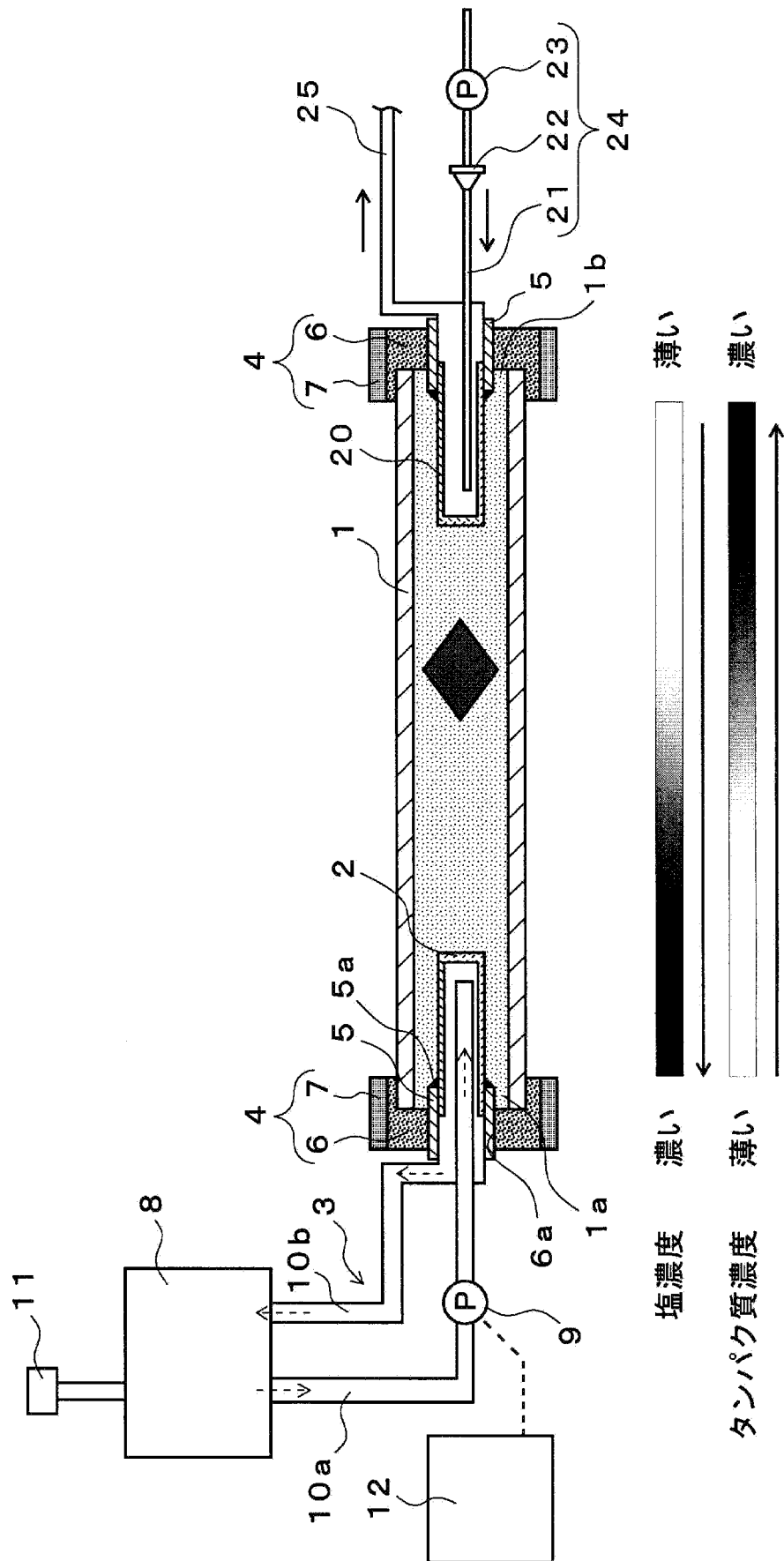
[請求項7] 上記密閉容器は、ガラスまたは石英からなることを特徴とする請求項4ないし6のいずれかに記載のタンパク質の結晶化装置。

[請求項8] 上記弾性部材は、硬度が15度～25度のシリコンゴムであることを特徴とする請求項4ないし7のいずれかに記載のタンパク質の結晶化装置。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/046880

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C07K1/00 (2006.01) i, B01D9/02 (2006.01) i, B01D61/00 (2006.01) i,
B01D61/14 (2006.01) i, C12M1/00 (2006.01) i

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. C07K1/00, B0109/02, B01D61/00, B01D61/14, C12M1/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2017
Registered utility model specifications of Japan	1996-2017
Published registered utility model applications of Japan	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP 2004-045169 A (RIKEN, JAPAN) 12 February 2004, claims, paragraphs [0019], [0020], fig. 1 & WO 2004/019008 A1	1 3 2, 4-8
X Y A	WO 2002/026342 A1 (BSI PROTEOMICS CORPORATION) 04 April 2002, claims, page 8, lines 1-14, fig. 1 & US 2004/0033166 A1 & EP 1444023 A1	1 3 2, 4-8
Y A	JP 2004-026528 A (JAPAN ATOMIC ENERGY RESEARCH INSTITUTE) 29 January 2004, claims, fig. 1, example 2 & US 2003/0233978 A1, claims, fig. 1, example 2	3 1-2, 4-8

☐ 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 application or patent 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
27 March 2018 (27.03.2018)

Date of mailing of the international search report
03 April 2018 (03.04.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K1/00(2006.01)i, B01D9/02(2006.01)i, B01D61/00(2006.01)i, B01D61/14(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i

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. C07K1/00, B01D9/02, B01D61/00, B01D61/14, C12M1/00

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	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の 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 請求項の番号
X Y A	JP 2004-045169 A (理化学研究所) 2004.02.12, 特許請求の範囲、[0019]、[0020]、図1 & WO 2004/019008 A1	1 3 2, 4-8
X Y A	WO 2002/026342 A1 (BSI PROTEOMICS CORPORATION) 2002.04.04, CLAIMS, 第8頁第1-14行、Fig.1 & US 2004/0033166 A1 & EP 1444023 A1	1 3 2, 4-8

☑ 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

27.03.2018

国際調査報告の発送日

03.04.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
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)

厚田 一拓

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

5575

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の 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 請求項の番号
Y A	JP 2004-026528 A (日本原子力研究所) 2004.01.29, 特許請求の範囲、図1、実施例2 & US 2003/0233978 A1, CLAIMS、Figure 1、EXAMPLE 2	3 1-2, 4-8