

(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
2012 年 10 月 4 日(04.10.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/133695 A1

- (51) 国際特許分類:
C30B 29/58 (2006.01) *C07K 1/30* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/058451
- (22) 国際出願日: 2012 年 3 月 29 日(29.03.2012)
- (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 2011-080944 2011 年 3 月 31 日(31.03.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): クニミネ工業株式会社(KUNIMINE INDUSTRIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1010032 東京都千代田区岩本町一丁目 10 番 5 号 Tokyo (JP). 学校法人東京理科大学 (TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE EDUCATIONAL FOUNDATION ADMINISTRATIVE ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目 3 番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 黒坂 恵一 (KUROSAKA, Keiichi) [JP/JP]; 〒9728318 福島県いわき市常磐関船町杭田 8 4 Fukushima (JP). 窪田

宗弘 (KUBOTA, Munehiro) [JP/JP]; 〒9718185 福島県いわき市泉町滝尻字定ノ田 1 2 7-1 ラークガーデン B 棟 2 0 1 号 Fukushima (JP). 坂口謙吾 (SAKAGUCHI, Kengo) [JP/JP]; 〒3002667 茨城県つくば市中別府 5 9 0-1 4 2 Ibaraki (JP). 稲生 溪太 (INO, Keita) [JP/JP]; 〒1710052 東京都豊島区南長崎 4-1-1 1 Tokyo (JP). 宇田川 いづみ (UDAGAWA, Itsumi) [JP/JP]; 〒3150054 茨城県かすみがうら市稲吉南 1-1 8-8 Ibaraki (JP). 岩端 一樹 (IWABATA, Kazuki) [JP/JP]; 〒2700031 千葉県松戸市横須賀 2-2-9 ラフィーフノ 1 0 3 Chiba (JP). 高草木 洋一 (TAKAKUS-AGI, Yoichi) [JP/JP]; 〒2780022 千葉県野田市山崎 2 7 0 1-1 チサンマンション野田 7 0 3 Chiba (JP). 関 泰隆 (SEKI, Yasutaka) [JP/JP]; 〒3430025 埼玉県越谷市大沢 3 4 1 5-4 Saitama (JP).

(74) 代理人: 飯田 敏三, 外 (HIDA, Toshizo et al.); 〒1050004 東京都港区新橋 3 丁目 1 番 1 0 号 石井ビル 3 階 Tokyo (JP).

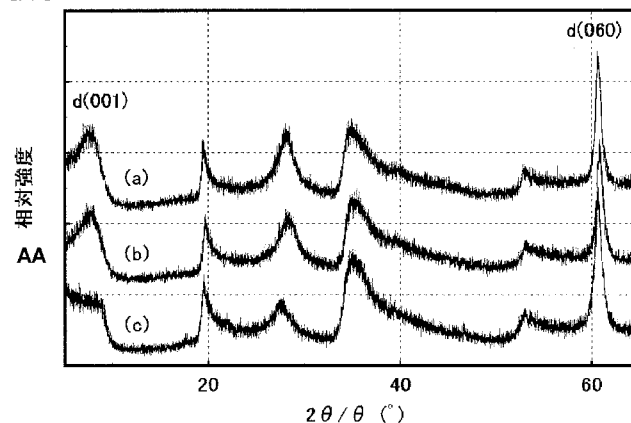
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,

[続葉有]

(54) Title: AGENT FOR SEARCHING FOR PROTEIN CRYSTALLIZATION CONDITIONS, AND METHOD FOR SEARCHING FOR PROTEIN CRYSTALLIZATION CONDITIONS

(54) 発明の名称: タンパク質結晶化条件探索剤及びタンパク質結晶化条件探索方法

[図1]



AA RELATIVE STRENGTH

(57) Abstract: [Problem] The objective of the present invention is to provide: an agent that is for searching for protein crystallization conditions and that has improved properties of promoting protein crystal formation and operability; and a method for searching for protein crystallization conditions. [Solution] The agent for searching for protein crystallization conditions contains a water-swallowable layered silicate having a fluorine atom and a hydroxyl group, the fluorine atom being covalently bonded to the silicate by means of isomorphous substitution with a hydroxyl group. The method for searching for crystallization conditions contains a step for mixing the agent for searching for protein crystallization conditions and a solution wherein a protein is dissolved.

(57) 要約: 【課題】本発明は、改善されたタンパク質結晶形成促進特性と操作性とを有するタンパク質結晶化条件探索剤及びタンパク質結晶化条件探索方法を提供することを目的とする。【解決手段】フッ素原子と水酸基とを有する水膨潤性層状ケイ酸塩を含み、前記フッ素原子は水酸基との同形置換により前記ケイ酸塩に共有結合している、タンパク質結晶化条件探索剤。タンパク質結晶化条件探索剤とタンパク質が溶解している溶液とを混合する工程を含む、結晶化条件探索方法。



CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラ

シア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

タンパク質結晶化条件探索剤及びタンパク質結晶化条件探索方法

技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質結晶化条件探索剤及びこれを用いたタンパク質結晶化条件探索方法に関する。より詳しくは、改善されたタンパク質結晶形成促進特性と操作性とを有するタンパク質結晶化条件探索剤及びこれを用いたタンパク質結晶化条件探索方法に関する。

背景技術

[0002] 構造生物学分野における技術革新は、タンパク質の構造と機能との関係の理解を深め、タンパク質の構造に基づく創薬の発展をもたらしている。タンパク質のX線結晶構造解析において、タンパク質の結晶化は必須の工程である。結晶化は、過飽和溶液中において結晶核が形成する過程と、結晶核が結晶へ成長する過程とを経る。

[0003] 構造解析における障害は、結晶化工程にある。結晶化条件が未知のタンパク質において結晶化を行う際、まず結晶化条件の探索が必須となる。タンパク質結晶化条件の探索は、第1次スクリーニングと第2次スクリーニングとから成る。第1次スクリーニングは、対象となるタンパク質の結晶化条件の広範囲な探索によってそのタンパク質の結晶化開始条件を決定することを目的とする物理条件及び化学条件の探索工程である。例えばこの工程にて結晶化に効果的なタンパク質濃度、沈殿剤の種類や濃度、緩衝液の種類やpH等を見極め、結晶化の開始が可能な条件を見出す。一方、第2次スクリーニングは、第1次スクリーニングを通じて選定された結晶化開始条件の改変によって対象となるタンパク質の最終結晶化条件を決定することを目的とする物理条件及び化学条件の精緻な探索工程である。第2次スクリーニングにおける結晶化開始条件の改変は、該結晶化開始条件を構成する物理条件及び化学条件の部分的な変更か、該結晶化開始条件に含まれていなかった新たな物理

条件及び化学条件の選択的な付加により行われる。例えば沈殿剤の濃度、緩衝液のpH等の条件を刻む、あるいは第1次スクリーニングで用いなかった添加剤や界面活性剤を用いる、さらにはその種類や濃度等の条件を刻み、最終的に最適な結晶化条件、具体的にはできるだけ大きく高品質な単結晶を得るための条件を見出す。いずれのスクリーニングも、対象となるタンパク質に応じて無数の物理条件及び化学条件の組み合わせの試行錯誤的な条件検討を必要とする。例えば沈殿剤の種類、溶液のpH、タンパク質溶液の濃度、温度といった多次元的な条件検討を経る。結晶化条件を決定し、得られた結晶は、X線照射により構造解析を行う。X線の照射の前に、結晶はクライオプロテクトANTを含む不凍液に浸漬されることがある。また、浸漬工程を省略することを望む場合、第1次又は第2次スクリーニングにおいてクライオプロテクトANTを含む沈殿剤溶液を用いてタンパク質の結晶化を試みる。いずれにしても、各スクリーニングは、所望の結晶が得られるまで繰り返される。

[0004] しかし、一般的にタンパク質は結晶核を自発的に形成しにくいいため、結晶化しにくい。加えて、新規タンパク質の結晶化条件は全く予想のつかないものであり、結晶化条件が既知のタンパク質に対しても新たな結晶化条件は予想のつかないものである。このような状況にあって、従来の第1次スクリーニングは、結晶のみならず結晶性沈殿物すら生成せず、結晶化開始条件を決定することができないことがあった。タンパク質の結晶化条件は溶媒や温度といった設定条件のわずかな変化で結晶核形成の有無が変化してしまうため、従来の第2次スクリーニングは、第1次スクリーニングにより選定した結晶化開始条件の改変に伴って、結晶が得られなくなることがあった。溶媒や温度といった設定条件の改変によるタンパク質の結晶核形成の制御は困難であるため、従来の第2次スクリーニングは、所望の大きさ及び個数の結晶を生成しない傾向があった。また、従来の第2次スクリーニングは、結晶化開始条件よりも低過飽和の条件であって、結晶核形成は起こらないが結晶成長は起こる潜在性を有する準安定領域と呼ばれる条件において、結晶を生成し

なかった。準安定領域においてタンパク質結晶が形成した場合、その結晶は十分に高品質である傾向があることが周知である。クライオプロテクトANTはタンパク質の結晶核形成を抑制するため、第1次及び第2次スクリーニングにおけるクライオプロテクトANTを含む試薬の使用は、タンパク質を結晶化しない傾向があった。以上のように、従来のスクリーニングシステムは、負荷の多い条件検討にもかかわらず、結局目的の結晶が得られなかったり貴重な試料であるタンパク質を浪費したりする傾向があった。従って、簡便で、経済的であり且つ信頼性が高いタンパク質結晶化条件の探索方法の開発が要求されている。

[0005] これに応じて、層状ケイ酸塩を用いたタンパク質結晶化の効率化の試みが提案されてきた。特許文献1は、層状ケイ酸塩を用いたタンパク質結晶化条件探索用のスクリーニングチップであって、該ケイ酸塩が支持体上に膜状に塗布されているスクリーニングチップを開示する。しかし、特許文献1の層状ケイ酸塩は、多様なタンパク質の結晶化条件を探索することを前提とするスクリーニングにおいて広範なタンパク質の結晶核形成を十分に促進しないという問題があった。また、均一な薄膜ではないため、容易に脱離する虞がある。しかも、特許文献1の発明は、スクリーニングチップの使用者が層状ケイ酸塩の最適な種類及び塗布量を選定することを必要とする。そのような条件検討は、多量のタンパク質溶液を消費する。また、スクリーニングチップとタンパク質溶液との非接触部分にケイ酸塩が存在するため、タンパク質溶液の広範な浸透が過飽和度の低下及びタンパク質の変性を引き起こす傾向がある。

[0006] 特許文献2及び3は、層状ケイ酸塩を用いたタンパク質結晶形成制御剤及び制御方法を開示する。しかし、特許文献2及び3の層状ケイ酸塩も、特許文献1のものと同様スクリーニングにおけるタンパク質の結晶核形成の促進が十分でない。また、特許文献2及び3の層状ケイ酸塩は、表面負電荷が弱く且つ水膨潤性が低いため、高濃度の沈殿剤を含有するスクリーニング試薬との接触により凝集及び沈降する傾向がある。

- [0007] 非特許文献1は、フッ素含有層状ケイ酸塩を含むリゾチーム結晶形成制御剤を開示する。非特許文献1は、リゾチームの結晶化における層状ケイ酸塩の使用を開示するが、多様なタンパク質の結晶化条件を探索することを前提とするスクリーニングにおける層状ケイ酸塩の使用については記載がない。また、非特許文献1の層状ケイ酸塩もスクリーニングにおけるタンパク質の結晶核形成の促進が十分とはいえない。
- [0008] 非特許文献2は、フッ素雲母を含むタンパク質結晶形成制御剤を開示する。このフッ素雲母は、タルクを出発原料として水分非存在下において固体反応法により合成される。しかし、非特許文献2のフッ素雲母は、水酸基を有さないため、結晶核形成速度を調整することができず、結晶核形成を促進しない場合が見られ、結晶化条件探索剤としては十分ではない。また、水に対して非膨潤性であるため、高濃度の沈殿剤を含有する試薬との接触により凝集及び沈降する傾向がある。従って、フッ素雲母の分散液の使用には、均一に分散させるための攪拌を要する。
- [0009] 非特許文献3は、層状ケイ酸塩を含む鉱物からなるタンパク質結晶形成制御剤を開示する。非特許文献3の鉱物を構成する層状ケイ酸塩は、タンパク質の結晶核形成の促進が十分とはいえない。
- [0010] 非特許文献4は、アミノ基を含有する雲母からなるタンパク質結晶形成制御剤を開示する。非特許文献4の雲母は、ハンギングドロップ法においてウェルの密閉に用いるためのシート状物を形成する。このシート状物は、タンパク質の結晶核形成の促進が十分とはいえない。

先行技術文献

特許文献

- [0011] 特許文献1：特開2005-350294号公報
特許文献2：特開2005-343856号公報
特許文献3：特開2005-343766号公報
非特許文献1：稻生 溪太、外9名、「含フッ素ケイ酸塩によるリゾチーム結晶核形成の促進」、[online]、第32回日本分子生物学会年会、講演要旨集

、3 P-0889、[2009年12月9日検索]

非特許文献2: Takehara M. et al., "Use of layer silicate for protein crystallization: Effects of Micromica and chlorite powders in hanging drops", Analytical Biochemistry, 2008, 373, p.322-329.

非特許文献3: McPherson A. et al., "Heterogeneous and epitaxial nucleation of protein crystals on mineral surfaces" Science, 1988, 239, p.385-387.

非特許文献4: Tang L. Et al., "Effects of silanized mica surface on protein crystallization" Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2005, 61, p.53-59.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明は、タンパク質の結晶化条件を探索するに当り、タンパク質結晶形成促進特性と操作性とが改善されたタンパク質結晶化条件探索剤、及びタンパク質結晶化条件探索方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、かかる事情に鑑み鋭意検討した結果、フッ素原子と水酸基とを有する水膨潤性層状ケイ酸塩を含み、前記フッ素原子は水酸基との同形置換によって前記ケイ酸塩に共有結合しているタンパク質結晶化条件探索剤を創出した。より詳しくは、本発明者らは、前記層状ケイ酸塩のフッ素原子と水酸基とのモル比率がタンパク質の結晶形成に関係し、結晶形成速度、及び結晶形成の確率を制御できることを見出した。本発明によれば、従来では十分に結晶化できなかった溶液条件においても結晶化できることを見出した。更に、本発明者らは、フッ素原子を有する水膨潤性層状ケイ酸塩の強い表面負電荷と優れた水膨潤性とが、タンパク質結晶化条件探索剤の操作性の向上に寄与することを見出した。本発明者らはこれらの知見に基づいて更に鋭意検討を重ね、本発明を成すに至った。

[0014] 即ち、本発明は、フッ素原子と水酸基とを有する水膨潤性層状ケイ酸塩を含み、前記フッ素原子は同形置換により前記ケイ酸塩に共有結合している、タンパク質結晶化条件探索剤を提供する。

また、本発明は、上記のタンパク質結晶化条件探索剤とタンパク質が溶解している溶液とを混合する工程を含む、タンパク質結晶化条件探索方法を提供する。

また、本発明は、前記タンパク質結晶化条件探索剤とタンパク質が溶解している溶液とを混合し、結晶化タンパク質を回収するタンパク質結晶化条件探索剤の使用を提供する。

本発明においてタンパク質の結晶化条件の探索とは、対象となるタンパク質の結晶化条件を探索するために物理条件及び化学条件を設定し、結晶形成の有無、結晶性沈殿物形成の有無、非結晶性沈殿物形成の有無、結晶化成功率、形成した結晶の形成時間、形状、大きさ、結晶核密度（単位面積あたりの結晶の個数）又はX線回折データを判断基準として、対象となるタンパク質の結晶化に適する物理条件及び化学条件を決定することをいう。

発明の効果

[0015] 本発明のタンパク質結晶化条件探索剤によれば、比較的負荷の少ない条件検討により効率的且つ実用的に結晶化条件探索ができる。

また、本発明のタンパク質結晶化条件探索方法によれば、比較的負荷の少ない工程でタンパク質の結晶化に適した条件を効率的且つ実用的に設定できる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、調製例1、調製例2及び調製例3のサポナイトのX線回折結果を示す図である。図1中、(a)は調製例1のサポナイトのX線回折パターン、(b)は調製例2のサポナイトのX線回折パターン、(c)は調製例3のサポナイトのX線回折パターンを示す。

[図2]図2は、調製例1、調製例2及び調製例3のサポナイトの窒素吸着／脱着等温線を示す。図2中、(a)は調製例1のサポナイトの等温線、(b)

は調製例2のサポナイトの等温線、(c)は調製例3のサポナイトの等温線を示す。

発明を実施するための形態

- [0017] 本明細書は、本発明の主題を特定して明確に請求する請求項にてまとめられるが、態様に関する以下の説明からより良く理解されるだろう。また、本発明の利点は、タンパク質結晶化のために設計されたあらゆるタンパク質結晶形成制御剤において享受されるが、本発明の添付図面に関連して、タンパク質の結晶化条件を探索するための結晶化条件探索剤の好適な態様として開示される。更に、本発明の他の特徴及び利点は、適宜添付の図面を参照して、態様に関する以下の説明及び特許請求の範囲から明らかである。
- [0018] 本明細書で使用される用語「スクリーニング」とは、対象物の結晶化条件を探索するための物理条件及び化学条件を設定し、結晶形成の有無、結晶性沈殿物形成の有無、非結晶性沈殿物形成の有無、結晶化成功率、形成した結晶の形成時間、形状、大きさ、結晶核密度又はX線回折データを判断基準として、対象物の結晶化に適する物理条件及び化学条件を決定する工程を指す。
- [0019] 本明細書で使用される用語「準安定領域」とは、対象物の結晶核形成は起こらないが結晶成長は起こる潜在性を有する過飽和条件の集合を指す。
- [0020] 本明細書で使用される用語「層状ケイ酸塩」とは、二次元的な層構造を有する化合物であって、その層構造が少なくともケイ素原子と電気的に陰性な配位子とから構成される化合物を指す。層状ケイ酸塩は、四面体層及び／若しくは八面体層の単独層、又はこれらの混合層を有してもよい。四面体シートはケイ素イオン (Si^{4+}) またはアルミニウムイオン (Al^{3+}) を4つの酸素イオン (O^{2-}) が囲んだ構造をとり、3つの頂点を隣の四面体と共有しその構造がヘキサゴナルネットワークをとり、シート状に連なっている。八面体シートはマグネシウムイオン (Mg^{2+})、またはアルミニウムイオンを6つの酸素イオン (O^{2-})、または水酸化物イオン (OH^-) が囲んだ八面体が稜を共有して2次的に広がったものである。四面体シートと八面体シー

トと組み合わせるときは四面体シートの頂点の酸素イオンが共有される。また、水酸化物イオンはフッ素イオン (F^-) により同形置換されることがある。

[0021] 本明細書で使用される用語「同形置換」とは、結晶構造を有するある化合物を構成するある原子が、化合物の結晶構造を変化させることなく、イオン半径の同一もしくは類似した他の原子に置き換わる反応を指す。

[0022] 本発明のタンパク質結晶化条件探索剤（以下、単に「結晶化条件探索剤」という。）は、フッ素原子と水酸基とを特定割合で有する水膨潤性層状ケイ酸塩を含む。該フッ素原子は、同形置換により層状ケイ酸塩に共有結合している。層状ケイ酸塩は、タンパク質と接触することによって、結晶核として機能する該タンパク質の凝集体を生成する。層状ケイ酸塩の層構造、フッ素原子及び水酸基は、タンパク質の結晶核形成を促進させることができる。層状ケイ酸塩のフッ素原子及び水膨潤性は、結晶化条件探索剤に均一な分散性及び成膜性を付与する。本発明の結晶化条件探索剤は、ナノグラム単位からマイクログラム単位までの量のタンパク質の結晶化のための結晶化条件の探索に好適である。

[0023] 前記結晶化条件探索剤は、層状ケイ酸塩のみから構成されてもよく、層状ケイ酸塩と他の成分との混合物から構成されてもよい。他の成分としては、例えば、純水、沈殿剤、緩衝剤、添加剤、有機溶媒及びこれらの混合成分が挙げられる。結晶化条件探索剤は、単一又は複数の層状ケイ酸塩を含んでよい。

[0024] 本発明の結晶化条件探索剤に用いる層状ケイ酸塩としては特に制限はないが、好ましくはモンモリロナイト、タルク、フロゴパイト、マイカ、カオリン、クロライト、パイロフィライト、バーミキュライト、エンデライト、クリソタイル、バイデライト、ハロイサイト、ノントロナイト、セリサイト、ディッカイト、アンチゴライト、ヘクトライト（フッ素ヘクトライト）、ソーコナイト、カネマイト、マカタイト、オクトシリケート、マガディアイト、ケニアイト、スチブンサイト及びサポナイトが挙げられる。より好ましくはマイカ、モンモリロナイト、スチブンサイト、ヘクトライト及びサポナイ

トであり、特に好ましくはサポナイトである。

[0025] 前記層状ケイ酸塩としては、天然品又は合成品が挙げられる。天然品は夾雑物を含んでよいが、核形成の厳密な結晶化制御の観点から、夾雑物は除去されることが好ましい。合成品は、高純度であり且つ合成時に同形置換効率を自在に制御することができる。したがって核形成において厳密な制御を可能とする。

[0026] 前記層状ケイ酸塩は、任意の平均粒径を有してよい。平均粒径は、均一分散性の観点から、 $2 \sim 50 \mu\text{m}$ であることが好ましい。平均粒径は、水を分散媒としたレーザー式粒度分布測定により決定してよい。

[0027] 前記層状ケイ酸塩は、任意の陽イオン交換容量を有してよい。陽イオン交換容量は、少なくとも $10 \text{ meq} / 100 \text{ g}$ であることが好ましく、少なくとも $60 \text{ meq} / 100 \text{ g}$ であることが更に好ましい。好適な範囲の陽イオン交換容量は、核形成促進に好適な負電荷を層状ケイ酸塩に付与する。

[0028] 前記層状ケイ酸塩は、比表面積は、 $1 \sim 1000 \text{ m}^2 / \text{g}$ であることが好ましく、 $10 \sim 500 \text{ m}^2 / \text{g}$ であることがより好ましく、 $100 \sim 200 \text{ m}^2 / \text{g}$ であることが更に好ましい。比表面積は、核形成促進に好適な表面電荷密度を層状ケイ酸塩に付与する。

[0029] 前記層状ケイ酸塩は、水膨潤性を有するため、高濃度の沈殿剤を含む試薬中において自然沈降しにくい。従って、改善された均一分散性、均一分散状態の長期安定性及び再分散性を有する分散液型の結晶化条件探索剤の提供を可能とする。また、水膨潤性層状ケイ酸塩は、優れた成膜性を有するため、均一な薄膜状の結晶化条件探索剤の提供を可能とする。

[0030] 前記層状ケイ酸塩は、スメクタイト族が好ましい。スメクタイト族は2：1型の層構造を有している。スメクタイト族の使用は、改善された均一性及び操作性を有する結晶化条件探索剤の提供を可能とする。

[0031] 前記層状ケイ酸塩は、前記スメクタイト族の中でも、サポナイトであることがより好まし。サポナイトは、四面体層のシリコン原子がアルミニウム原子に置換された層構造を有しているため、永久負電荷を有する。

サポナイトは、結晶化条件探索剤にメソ細孔に起因する核形成促進特性を付与する。サポナイトの使用は、結晶化条件探索剤に、単一品でより多様なタンパク質の結晶核形成を促進することを可能とし、且つ改善された均一性及び操作性を付与することを可能とする。

[0032] 前記層状ケイ酸塩は、水酸基はその結合形態は問わない。例えば、層状ケイ酸塩は、共有結合により水酸基を結合していてもよい。層状ケイ酸塩は、水酸基を含有する化合物を直接的に又は間接的に結合してもよい。

[0033] 好適な態様において、前記水酸基は、層状ケイ酸塩の結晶構造内に共有結合している。フッ素原子と水酸基を有する層状ケイ酸塩は、タンパク質溶液中においてタンパク質を吸着し、結晶核として機能するタンパク質の凝集体を生成する。また、水酸基のフッ素原子とのモル比率は合成時の仕込みフッ素原料の添加量によって制御できる。

[0034] 前記フッ素原子は、同形置換により層状ケイ酸塩の結晶構造内に共有結合している。また、フッ素原子を同形置換させた層状ケイ酸塩は、陽イオン交換容量が比較的大きくなるため、層状ケイ酸塩の表面電荷密度を増加させる。従って、同形置換によりフッ素原子を導入した層状ケイ酸塩は、タンパク質溶液中においてタンパク質を高密度に吸着し、結晶核として機能するタンパク質の凝集体を効果的に生成する。

また、フッ素原子を同形置換させることで層状ケイ酸塩の永久負電荷が同形置換していないものに比べ増加し、層状ケイ酸塩の粒子間に強い静電的反発力を作用させる。従って、結晶化条件探索剤は、高濃度の沈殿剤を含む試薬と接触しても凝集しにくく、改善された均一性を有する。

[0035] フッ素原子と水酸基とを有する層状ケイ酸塩は、通常の方法により合成することができる。合成方法としては、例えば、水熱合成法、溶融合成法、高压合成法、固体反応法、火炎溶融法及び変質法が挙げられる。これらの中でも、フッ素源を用いた水熱合成が好ましい。フッ素源を用いた水熱合成は、同形置換により生成物にフッ素原子と水酸基とを容易に導入することができる。また、フッ素源を用いた高压合成法、固体反応法、火炎溶融法及び変質

法により、フッ素原子と水酸基とを有する層状ケイ酸塩を合成してもよい。更に、フッ素含有層状ケイ酸塩に水酸基を導入することによって、フッ素原子と水酸基とを有する層状ケイ酸塩を合成してもよい。

[0036] 前記層状ケイ酸塩中のフッ素原子、及び水酸基のモル比率は、タンパク質の結晶化成功率、結晶化速度、結晶核密度、及び結晶の大きさに影響を与える。特に、フッ素原子のモル比率と核形成頻度との間には正の相関関係があり、フッ素原子のモル比率と結晶の大きさとの間には負の相関関係がある。フッ素含有量、及びフッ素原子と水酸基のモル比率は、合成した試料を蒸留水に分散後、濾過、あるいは遠心分離を数回行うことによって遊離フッ素及び可溶性イオンを洗浄除去した層状ケイ酸塩を用いて、蛍光X線装置（R i g a k u社製、R I X 1 0 0 0）により定量、算出してよい。

[0037] 好適な態様において、前記層状ケイ酸塩中のフッ素原子と水酸基に占めるフッ素原子のモル比率は好ましくは3%～15%である。より好ましくは4%～12%であり、最も好ましくは5～10%である。また、水酸基のモル比率は好ましくは85%～97%であり、より好ましくは88%～96%であり、最も好ましくは90%～95%である。この範囲において、層状ケイ酸塩は核形成促進効果を有するため、結晶化条件探索剤を用いた第1次スクリーニングにおける結晶化成功率を向上することができる。また、該モル比率を適宜に調節することによって、結晶化成功率、結晶形成速度、結晶の大きさ及び結晶核密度を制御できる。結晶化条件探索剤のフッ素原子のモル比率が少なすぎる（水酸基のモル比率が大きすぎる）と、層状ケイ酸塩は効果的に結晶核形成を促進しないため、第1次及び第2次スクリーニングにおいて所望の結晶を得られないことがある。また、フッ素原子のモル比率が大きすぎる（水酸基のモル比率が小さすぎる）と結晶の大きさが小さくなること、またはX線回折用等の高品質な結晶を得られないことがある。なお、本発明の結晶化条件探索剤を用いた第1次スクリーニングにより選定された結晶化開始条件が既に所望のタンパク質結晶を形成する場合、第2次スクリーニングを行わなくてもよい。また、結晶化開始条件が既に見出されている場合

、第2次スクリーニングのみに本発明の結晶化条件探索剤を適用してもよい。

[0038] 前記結晶化条件探索剤は、層状ケイ酸塩以外の層状無機化合物を含有してよい。層状無機化合物としては、例えば、層状金属水酸化物及び層状複水酸化物が挙げられる。

[0039] 前記結晶化条件探索剤は、任意のタンパク質結晶形成制御剤を含有してよい。好適な結晶形成制御剤は、特開2007-55931号公報、国際公開2004/041847号公報、国際公開02/088435号公報及び特開平8-294601号公報に開示される。これらの好適な結晶形成制御剤は、参照によって本明細書に組み込まれる。

[0040] 前記結晶化条件探索剤は、タンパク質の溶解度を下げるための任意の沈殿剤を含んでよい。沈殿剤としては、例えば、塩、水溶性高分子化合物、有機溶媒及びこれらの混合成分が挙げられる。

塩としては、例えば、硫酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、硝酸ナトリウム、フッ化ナトリウム、酒石酸ナトリウム、ギ酸ナトリウム、リン酸アンモニウム、硫酸リチウム、塩化コバルト、硫酸亜鉛及びマロン酸ナトリウムが挙げられる。

水溶性高分子化合物としては、例えば、分子量400～20000のポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールモノアルキルエーテル及びポリエチレンイミンが挙げられる。

有機溶媒としては、例えば、エタノール、メタノール、アセトン、2-メチル-2,4-ペンタジオール、イソプロパノール、ブタノール、ジオキサン、ジメチルスルホキシド及びジメチルホルムアミドが挙げられる。

[0041] 前記結晶化条件探索剤は、界面活性剤を含んでよい。界面活性剤としては、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸リチウム、ドデシルジメチルアミン-N-オキシド、N-デシル- β -D-マルトシド、N-ドデシル- β -D-マルトピラノシド、N-オクチル- β -D-グルコピラノシド

、N-オクチル- β -D-チオグルコピラノシド、N-ノニル- β -D-チオマルトシド、ポリオキシエチレン-オクチルフェニルエーテル、デカノイル-N-メチルグルカミド及びスクロースモノラウレートが挙げられる。

[0042] 前記結晶化条件探索剤は、クライオプロテクタントを含んでよい。クライオプロテクタントとしては、例えば、グリセロール、エチレングリコール、スクロース及びトレハロースが挙げられる。

[0043] 前記結晶化条件探索剤は、任意の添加剤を含んでよい。添加剤としては、例えば、リガンド、阻害剤、補酵素、基質、アミノ酸、ゲル、抗体及びこれらの混合物が挙げられる。好適なアミノ酸は、国際公開2008/102469号公報に開示される。また、好適なゲルは、特開2007-45668号公報に開示される。これらの好適なアミノ酸及びゲルは、参照によって本明細書に組み込まれる。

[0044] 前記結晶化条件探索剤は、タンパク質の結晶化に悪影響を及ぼさない範囲で、イオン液体を含んでよい。好適なイオン液体は、Russell A. Judge et al., "The Effect of Ionic Liquids on Protein Crystallization and X-ray Diffraction Resolution", CRYSTAL GROWTH & DESIGN, 2009, Vol. 9, No. 8, p. 3463-3469. に記載される。この好適なイオン液体は、参照によって本明細書に組み込まれる。

[0045] 前記結晶化条件探索剤は、任意の試薬を含んでよい。好適な試薬は、特開2006-83126号公報に開示される。この好適な試薬は、参照によって本明細書に組み込まれる。

[0046] 前記結晶化条件探索剤の剤型は、いずれでもよい。例えば、固形剤、分散液剤及び粘土状の半固形剤が挙げられる。好適な態様において、結晶化条件探索剤は、粉末状の層状ケイ酸塩を分散媒に添加した分散液剤か、層状ケイ酸塩を支持体上に塗布した薄膜状の固形剤である。フッ素原子を有する水膨潤性層状ケイ酸塩の分散液剤は、高濃度の沈殿剤等を含有する試薬中において凝集及び沈降しにくい。薄膜状の固形剤は、分散液を作製する必要がないため、結晶化条件の探索における操作性を改善することができる。

[0047] 薄膜状の固形剤を担持する支持体はいずれでもよいが、好ましくはカバーガラス、スライドガラス、プレート、ブリッジ又はロッドであり、特に好ましくはブリッジである。ブリッジに塗布した薄膜状の固形剤は、シッティングドロップ蒸気拡散法による迅速な結晶化条件の探索を可能とする。

[0048] 前記結晶化条件探索剤は、通常の分散媒を用いることができる。分散媒としては、例えば、純水、緩衝液、沈殿剤溶液、界面活性剤溶液、アルコール、有機溶媒、キレート剤溶液、還元剤溶液、クライオプロテクタント溶液、イオン液体、ミネラルオイル及びこれらの混合溶媒が挙げられる。

[0049] 好適な態様において、前記分散媒は非イオン性の水溶性高分子化合物の水溶液である。非イオン性の水溶性高分子化合物としては、ポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールモノアルキルエーテルが挙げられる。この分散媒の使用は、層状ケイ酸塩粒子の凝集及び沈降を効果的に防止し、攪拌せずに均一な分散液を分取することを可能とする。

従って、前記分散媒の使用は、手動による効率的な結晶化条件探索の実施を可能とするだけでなく、攪拌装置を具備しない公知の結晶化自動化装置との組み合わせによる効率的な結晶化条件の探索を可能とする。好適な自動化装置は、特開2010-151821号公報、特開2006-281139号公報、特開2003-14596号公報、特開2004-194647号公報及び特表2003-502652号公報に開示されている。これらの好適な自動化装置は、参照によって本明細書に組み込まれる。

[0050] 別の好適な態様において、前記結晶化条件探索剤は固形剤である。固形剤としては、例えば、粉末、顆粒、厚膜、薄膜、錠剤及び凍結乾燥剤が挙げられる。厚膜状又は薄膜状の固形剤は、自立膜であっても支持体状に担持された膜であってもよい。厚膜状又は薄膜状の結晶化条件探索剤は、一切の攪拌を必要としないため、改善された操作性を有する。更に、厚膜状又は薄膜状の結晶化条件探索剤は、界面活性剤を含む試薬を用いても泡立つことがないため、改善された均一性を有する。従って、厚膜状又は薄膜状の結晶化条件探索剤は大規模なハイスループットスクリーニングに好適である。

- [0051] 前記厚膜状又は薄膜状の固形剤は、任意の成膜方法により形成してよい。好適な成膜方法は、特開2008-119659号公報、特開2008-18299号公報、特開2006-150160号公報、特開2005-163058号公報及び特開2001-220244号公報に開示される。これらの好適な成膜方法は、参照によって本明細書に組み込まれる。
- [0052] 更に好適な態様において、前記結晶化条件探索剤は、支持体上に塗布した薄膜状の固形剤である。薄膜状の固形剤は、層状ケイ酸塩の塗布面にムラがないため支持体から容易に脱離することがないだけでなく、結晶核形成を厳密に制御することができる。薄膜状の固形剤は、更に改善された均一性及び操作性を有する。薄膜は、支持体のタンパク質と接触する部分のみに形成することが好ましい。この構成により、層状ケイ酸塩の使用量を低減することができるだけでなく、タンパク質溶液の広範な浸透によるタンパク質の過剰な浪費及び水分の急激な減少を防ぐことができる。
- [0053] 更に好適な態様において、支持体はカバーガラス、スライドガラス、プレート、ブリッジ又はロッドである。好適な支持体は、特開2002-179500号公報、特開2002-233702号公報、特表2006-500960号公報、米国特許第5419278号明細書及び米国特許第5096676号明細書に開示される。これらの好適な支持体は、参照によって本明細書に組み込まれる。この構成は、手動による効率的なスクリーニングの実施を可能とするだけでなく、攪拌装置を具備しない公知の結晶化自動化装置との組み合わせによる効率的なスクリーニングの実施を可能とする。
- [0054] 前記結晶化条件探索剤が対象とするタンパク質の種類は、特に制限されない。タンパク質としては、例えば、酸性タンパク質、塩基性タンパク質、中性タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、膜タンパク質、酵素、抗体、受容体、転写因子、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質同士の複合体、タンパク質と核酸との複合体、タンパク質と低分子化合物との複合体、タンパク質と補酵素との複合体、タンパク質と糖類との複合体、タンパク質と金属との複合体及び酵素と基質との複合体が挙げられ、好ましくは酸性

タンパク質、塩基性タンパク質、中性タンパク質である。これらのタンパク質は、任意の分子量及び等電点を有してよい。

[0055] 前記タンパク質は、純水や緩衝液に対し、可溶性であっても不溶性であってもよい。不溶性タンパク質は、任意の可溶化剤を用いて溶解してよい。好適な可溶化剤は、特開2007-314526号公報、特表2001-519836号公報、特開平5-125092号公報及び特開平5-32689号公報に開示される。これらの好適な可溶化剤は、参照によって本明細書に組み込まれる。

[0056] 前記タンパク質は、天然のタンパク質であっても人工のタンパク質であってもよい。タンパク質は、種々の方法により合成した人工のものでもよい。人工のタンパク質としては、例えば、遺伝子組換え技術により合成した発現タンパク質、化学合成法により合成したタンパク質及び発酵法により合成したタンパク質が挙げられる。発現タンパク質は、任意の発現系を用いて合成したものでもよい。発現系としては、例えば、大腸菌発現系、酵母発現系、昆虫細胞発現系、哺乳類細胞発現系及び無細胞発現系が挙げられる。好適な発現系は、特開2010-63386号公報、特開2010-11851号公報、特開2008-193953号公報、特表2008-538503号公報、特表2007-501007号公報、特表2006-502691号公報、特表2006-508684号公報、特表2005-517385号公報、特表2004-506428号公報及び特表2003-511067号公報に開示される。これらの好適な発現系は、参照によって本明細書に組み込まれる。

[0057] 前記発現タンパク質は、適宜にタグタンパク質を融合してよい。好適なタグタンパク質は、特開2010-75090号公報、特表2004-532025号公報、特開2003-289882号公報及び特開2003-38195号公報に開示される。これらの好適なタグタンパク質は、参照によって本明細書に組み込まれる。

[0058] 前記タンパク質を溶解する溶媒は特に制限するものではない。タンパク質

の溶解溶媒としては、例えば、純水、緩衝液、沈殿剤溶液、界面活性剤溶液、アルコール溶液、有機溶媒、キレート剤溶液、還元剤溶液、クライオプロテクタント溶液、イオン液体及びこれらの混合溶液が挙げられる。好ましくは、溶解溶媒は緩衝液である。緩衝成分としては、例えば、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、カコジル酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、イミダゾール、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、グッド緩衝剤及びこれらの混合成分が挙げられる。緩衝液は任意の pH であり得、例えば、pH 3.5～10.0 の範囲である。

[0059] 本発明の結晶化条件探索方法は、上記のフッ素原子と水酸基とを有する水膨潤性層状ケイ酸塩を含む結晶化条件探索剤と、タンパク質が溶解している溶液とを混合する工程を含む。

[0060] タンパク質溶液の濃度は、タンパク質が溶解している限りにおいて特に制限されない。結晶化を効果的に促進する観点から、タンパク質初濃度は高いことが好ましく、好ましくは 2 mg/mL 以上、より好ましくは 5 mg/mL～200 mg/mL であり、飽和溶解度付近の濃度であることが特に好ましい。

[0061] 前記タンパク質溶液に対する結晶化条件探索剤の添加量は特に制限されないが、タンパク質溶液中における層状ケイ酸塩の最終濃度を少なくとも 0.01% (w/v) とすることが好ましく、0.01%～1.0% (w/v) とすることがより好ましい。高い核形成頻度を得るためには、層状ケイ酸塩の最終濃度を 0.01%～0.5% (w/v) とすることが好ましく、0.05%～0.3% (w/v) とすることがより好ましく、0.1%～0.2% (w/v) とすることが更に好ましい。

[0062] 前記タンパク質は、結晶化の手法は特に制限はない。結晶化方法としては、例えば、バッチ法、蒸気拡散法、透析法、自由界面拡散法、濃縮法、照射法、振動法及び攪拌法が挙げられる。蒸気拡散法としては、ハンギングドロップ法、シッティングドロップ法及びサンドイッチドロップ法を好適に用いられる。蒸気拡散法は、微量のタンパク質を用いたスクリーニングを容易

且つ迅速に行うことを可能とする。好適な結晶化方法は、特開2010-13420号公報、特開2010-1220号公報、特開2003-306497号公報、特許第4029987号公報及び特開平6-116098号公報に開示される。これらの好適な結晶化方法は、参照によって本明細書に組み込まれる。

[0063] 前記タンパク質は、任意の容器を用いて結晶化してよい。好適な容器は、特開2009-172530号公報、特開2008-309617号公報、特開2008-126135号公報、特開2007-1788号公報、特開2006-124238号公報、特開2006-308607号公報、特表2005-502571号公報、特表2005-515151号公報、特表2006-525864号公報、特開2004-307335号公報、特開2003-248004号公報、特表2002-528701号公報、特表2002-536255号公報、特開平11-130600号公報、米国特許第5,096,676号明細書、米国特許第5,130,105号明細書、米国特許第5,221,410号明細書及び国際公開01/088231号公報に開示される。これらの好適な容器は、参照によって本明細書に組み込まれる。

[0064] 前記タンパク質は、任意の温度条件によって結晶化してよい。温度は4〜37℃であることが好ましく、4〜20℃であることが更に好ましい。

[0065] 形成した結晶は、顕微鏡を用いて観察してよい。顕微鏡としては、例えば、実体顕微鏡、光学顕微鏡、偏光顕微鏡、電子顕微鏡が挙げられる。また、結晶は、肉眼で観察してもよいし、結晶検出装置を用いて観察してもよい。好適な結晶検出装置は、特開2007-45663号公報、特開2005-9949号公報、特開2006-242690号公報、特開2004-323336号公報及び特開2007-248280号公報に開示される。これらの好適な結晶検出装置は、参照によって本明細書に組み込まれる。

[0066] 前記形成した結晶は、X線回折装置により分析してよい。X線回折は、結晶化条件探索剤の結晶への付着の有無に関わらず行うことができる。本発明

の結晶化条件探索剤はX線回折実験に悪影響を及ぼすものではなく、結晶化条件探索剤が付着した結晶を用いても良好なX線回折像を取得することができる。

[0067] 前記形成した結晶は、新たな結晶化条件の探索を実施するための種結晶として使用してよい。

また、本発明の結晶化条件探索剤は、タンパク質結晶形成制御剤又はタンパク質結晶形成促進剤として使用してもよい。さらに、本発明の結晶化条件探索剤は、タンパク質結晶化を用いた工業的なタンパク質精製に適用してもよいし、タンパク質以外の他の生体高分子の結晶化に適用してもよい。これらの用途には、本発明の結晶化条件探索剤を造核剤や結晶核形成剤として作用させる場合も包含される。

実施例

[0068] 以下、調製例、試験例、比較試験例に基づいて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はその要旨を越えない限りこれらに限定されるものではない。

[0069] 調製例 1

Na型サポナイト理論化学式 $\text{Na}_{0.33}(\text{Mg}_3)(\text{Al}_{0.33}\text{Si}_{3.67})\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ に基づき、水ガラス（北越化学工業株式会社製）、硫酸マグネシウム（関東化学株式会社製）及び硫酸アルミニウム（関東化学株式会社製）を、モル比率が $\text{Si}:\text{Mg}:\text{Al}=3.67:3:0.33$ となるように反応させ、水和ゲル1.5 Lを調製した。この水和ゲルにフッ化ナトリウム（関東化学株式会社製）を溶解させた水溶液0.5 Lを加え、2 Lの反応ゲルを調製した。反応ゲルを3 Lオートクレーブ容器に入れ、250℃にて4時間水熱合成を行った。水熱合成後の生成物（1 L）を濾紙で吸引濾過して、水分を除去した。得られたケーキに水2 Lを加えて攪拌することにより再分散し、これを再濾過した。再分散及び再濾過操作を3回繰り返すことで未反応物を洗浄除去した。得られたケーキを乾燥することによって、フッ素原子と水酸基とを有する合成サポナイト（以下、調製例1のサポナイトと呼ぶこ

とがある)を得た。

[0070] 調製例 2

調製例 1 においてフッ化ナトリウムの配合量を変えたこと以外は調製例 1 と同じ方法で、フッ素原子と水酸基とを有する合成サポナイト (以下、調製例 2 のサポナイトと呼ぶことがある) を得た。

[0071] 調製例 3

調製例 1 においてフッ化ナトリウムの代わりに水酸化ナトリウム (関東化学株式会社製) を配合したこと以外は調製例 1 と同じ方法で、水酸基を有する合成サポナイト (以下、調製例 3 のサポナイトと呼ぶことがある) を得た。

[0072] 図 1 に、X線回折装置 (R i g a k u 社製、M i n i F l e x) による解析結果を示す。図 1 において、(a) は調製例 1 のサポナイトの X 線回折パターン、(b) は調製例 2 のサポナイトの X 線回折パターン、(c) は調製例 3 のサポナイトの X 線回折パターンを示す。 $2\theta/\theta = 7.8 \sim 8.8^\circ$ における $d(001)$ ピークの存在は、各試料が $10.0 \sim 11.3 \text{ \AA}$ の層間距離を有する層状化合物であることを示す。 $2\theta/\theta = 60.7 \sim 60.9^\circ$ ($1.53 \text{ \AA}$) における $d(060)$ ピークの存在は、各試料が 3-八面体型の層構造を有するサポナイトであることを示す。 $2\theta/\theta = 39.0^\circ$ におけるピークの非存在は、各試料が遊離したフッ化ナトリウムを含有しないことを示す。従って、調製例 1 及び調製例 2 のサポナイトは、フッ素原子と水酸基とを有し、該フッ素原子は同形置換により各サポナイトに共有結合していることが分かる。

[0073] 表 1 に、調製例 1、調製例 2 及び調製例 3 のサポナイトのフッ素原子、及び水酸基のモル比、及びモル比率を示す。フッ素含有量は、蛍光 X 線測定装置 (R i g a k u 社製、R I X 1 0 0 0) によって得られたフッ素原子の含有量である。表 1 より、調製例 1、及び調整例 2 のサポナイトは、それぞれ 0.86 質量%、 0.53 質量%のフッ素原子を含むことが分かる。さらに蛍光 X 線分析の結果から「粘土ハンドブック第 3 版」に記載の方法にて調整

例のサポナイト化学式を算出することで、フッ素原子と水酸基の化学式中のモル比を得た。また、フッ素原子と水酸基の合計モル比を100%としたときのモル比率を表1に示す。

[0074] [表1]

表1

	F含有量 (wt%)	モル比		モル比率(%)	
		F	OH	F	OH
調整例1	0.86	0.188	1.812	9.4	90.6
調整例2	0.53	0.114	1.886	5.7	94.3
調整例3	0	0.000	2.000	0.0	100.0

[0075] 図2に、液体窒素温度条件下における窒素吸着／脱着等温線を示す。図2において、(a)は調製例1のサポナイトの等温線、(b)は調製例2のサポナイトの等温線、(c)は調製例3のサポナイトの等温線を示す。各試料の等温線は、IUPAC分類におけるIV型に相当する形状を有し、それは典型的な層状化合物であることを示す。相対圧が0.40から1.00の範囲に見られるH2ヒステリシスループは、直径2～50nmのメソ細孔の存在を示す。これらのメソ細孔は、サポナイトのカードハウス構造に由来すると考えられる。このカードハウス構造は、扁平なナノ粒子の端面と側面との不規則的な積み重ねにより形成される。

[0076] 表2に調製例1、調製例2及び調製例3のサポナイトの陽イオン交換容量、比表面積及び表面電荷密度の分析結果を示す。陽イオン交換容量は、酢酸アンモニウムを用いたショーレンバーガー(Schollenberger)法に基づいて測定した。窒素吸着等温線は、窒素吸着量測定装置(Quantachrome Instruments社製、AUTOSORB-1)を用いて求めた。各試料の水分は、吸着した窒素の体積(窒素吸着量)の測定に際し、200℃において3時間脱気することによって除去した。比表面積は、図2の窒素吸着等温線における相対圧が0.050から0.30の範囲における吸着した窒素の体積のデータを用いて、ブルナー・エメット・テラー(Brunauer-Emmett-Teller: BET)法によって決定した。表面電荷密度は、比表面積に対する陽イオン交換容量と定義

した。

[0077] [表2]

表2

	陽イオン交換容量 (meq/100g)	比表面積 (m ² /g)	表面電荷密度 (10 ⁻³ meq/m ²)
調製例 1	94.3	151.45	6.23
調製例 2	84.1	176.66	4.76
調製例 3	70.6	227.23	3.11

[0078] 表2より、フッ素原子のモル比率の増加に伴い、各試料の陽イオン交換容量は増加し、比表面積は減少することが分かる。従って、フッ素原子のモル比率の増加に伴い、各試料の表面電荷密度は増加することが分かる。これは、フッ素が同形置換されたサポナイトは負電荷が強く、且つ表面電荷密度が大きいことを示す。

[0079] (実施例1) リゾチームを用いた結晶化促進の評価

試験例1-1

鶏卵白リゾチームの第1次スクリーニングに薄膜状の調製例1のサポナイトを適用した。所定の濃度のリゾチーム溶液を用い、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。

[0080] 沈殿剤溶液として、市販のスクリーニングキットであるCrystal Screen 1 (Hampton Research社製)を用いた。このキットは、表3に示す50種類の沈殿剤溶液を含む。

タンパク質溶液として、鶏卵白リゾチーム(和光純薬工業(株)製)を、0.150 mol/L塩化ナトリウムを含む0.020 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解し、8 mg/mLリゾチーム溶液を調製した。

[0081]

[表3]

番号	塩	濃度	pH調整液	沈殿剤1		沈殿剤2	
				濃度	分散液	濃度	分散液
1	0.020 M 塩化ナトリウム三水合物	0.10 M	調整ナトリウム三水合物 pH 4.6	30% w/v	2-メチル-2,4-ペンタジオール	—	—
2	—	—	—	0.40 M	濃硝酸ナトリウムトリウム三水合物	—	—
3	—	—	—	2.0 M	リン酸アンモニウム	—	—
4	—	—	—	30% w/v	リン酸アンモニウム	—	—
5	0.20 M クエン酸三ナトリウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 7.5	2.0 M	2-メチル-2,4-ペンタジオール	—	—
6	0.20 M 塩化マグネシウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 8.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
7	—	—	—	1.4 M	調整ナトリウム三水合物	—	—
8	0.20 M クエン酸三ナトリウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 6.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
9	0.20 M 調整アンモニウム	0.10 M	調整ナトリウム三水合物 pH 5.6	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
10	0.20 M 調整アンモニウム	0.10 M	調整ナトリウム三水合物 pH 4.6	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
11	—	—	—	1.0 M	調整ナトリウム三水合物	—	—
12	0.20 M 塩化マグネシウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 7.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
13	0.20 M クエン酸三ナトリウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 8.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
14	0.20 M 塩化ナトリウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 7.5	28% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
15	0.20 M 調整アンモニウム	0.10 M	調整ナトリウム三水合物 pH 6.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
16	—	—	—	1.5 M	調整ナトリウム三水合物	—	—
17	0.20 M 調整ナトリウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 7.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
18	0.20 M 調整ナトリウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 8.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
19	0.20 M 調整アンモニウム	0.10 M	調整ナトリウム三水合物 pH 6.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
20	0.20 M 調整アンモニウム	0.10 M	調整ナトリウム三水合物 pH 4.6	25% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
21	0.20 M 調整ナトリウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 6.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
22	0.20 M 調整ナトリウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 8.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
23	0.20 M 調整ナトリウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 7.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
24	0.20 M 調整ナトリウム三水合物	0.10 M	調整ナトリウム三水合物 pH 4.6	20% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
25	—	—	—	1.0 M	調整ナトリウム三水合物	—	—
26	0.20 M 調整アンモニウム	0.10 M	調整ナトリウム三水合物 pH 5.6	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
27	0.20 M クエン酸三ナトリウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 7.5	20% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
28	0.20 M 調整ナトリウム三水合物	0.10 M	トリセピドキシエチル-1-ペラジエタ-2,6-ジカルボキシ酸ナトリウム pH 6.5	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
29	—	—	—	0.80 M	濃硝酸ナトリウムトリウム三水合物	—	—
30	0.20 M 調整アンモニウム	—	—	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
31	0.20 M 調整アンモニウム	—	—	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
32	—	—	—	2.0 M	調整アンモニウム	—	—
33	—	—	—	2.0 M	調整ナトリウム	—	—
34	—	—	—	0.80 M	調整ナトリウム三水合物	0.80 M	調整ナトリウム
35	—	—	—	3.0% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
36	—	—	—	5.0% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
37	—	—	—	1.4 M	調整ナトリウム三水合物	—	—
38	—	—	—	2.0% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
39	—	—	—	20% w/v	調整ナトリウム三水合物	2.0 M	調整アンモニウム
40	—	—	—	10% w/v	調整ナトリウム三水合物	20% w/v	調整ナトリウム三水合物
41	—	—	—	20% w/v	調整ナトリウム三水合物	20% w/v	調整ナトリウム三水合物
42	0.050 M リン酸三水合物	—	—	30% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
43	—	—	—	0.20 M	調整ナトリウム三水合物	—	—
44	—	—	—	1.0 M	調整ナトリウム三水合物	—	—
45	0.20 M 調整ナトリウム三水合物	0.10 M	調整ナトリウム三水合物 pH 6.5	15% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
46	0.20 M 調整ナトリウム三水合物	0.10 M	調整ナトリウム三水合物 pH 6.5	15% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
47	—	—	—	2.0 M	調整アンモニウム	—	—
48	—	—	—	2.0 M	調整アンモニウム	—	—
49	1.0 M 調整ナトリウム三水合物	—	—	15% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—
50	0.50 M 調整ナトリウム三水合物	—	—	15% w/v	調整ナトリウム三水合物	—	—

[0082] 純水に調製例1のサポナイトを添加し、0.2% (w/v) サポナイト分散液を調製した。5 μ Lの分散液をマイクロブリッジ (Hampton Research社製) の上に滴下し、室温で脱気して乾燥することによって、マイクロブリッジ上にサポナイトの薄膜を形成した。

[0083] シットティングドロップのセットアップに際し、24ウェルプレート（T P P社製）のウェルに各沈殿剤溶液を400 μ L添加し、薄膜を形成したマイクロブリッジを入れた。マイクロブリッジに形成した薄膜上で、リゾチーム溶液5 μ Lと表3に記載の沈殿剤溶液5 μ Lとを混合した。ウェルの入り口に高真空グリース（ダウコーニング・東レ（株）製）を塗布し、カバーガラス（松浪硝子工業（株）製）を用いて密封し、20 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cで1ヶ月静置した。1ヶ月静置後、偏光顕微鏡観察（倍率40倍）により結晶の有無を調べた。

[0084] 試験例1-2

試験例1-1において調製例1のサポナイトの代わりに調製例2のサポナイトを使用したこと以外は、試験例1-1と同じ方法で試験した。

[0085] 比較試験例1-1

試験例1-1において調製例1のサポナイトの代わりに調製例3のサポナイトを使用したこと以外は、試験例1-1と同じ方法で試験した。

[0086] 比較試験例1-2

試験例1-1においてマイクロブリッジ上に0.2%（w/v）サポナイト分散液の代わりに純水を滴下し、サポナイトを塗布しないマイクロブリッジを使用したこと以外は、試験例1-1と同じ方法で試験した。

[0087] 試験例1-1、試験例1-2、比較試験例1-1及び比較試験例1-2の結果を表4に示す。表4に示す番号は、使用した50種類の沈殿剤溶液のうち結晶化した溶液の番号である。結晶化成功率は、使用した50種類の沈殿剤溶液のうち結晶化した溶液の割合を示す。

[0088] [表4]

表4

	結晶化した沈殿剤溶液の番号	結晶化成功率(%)
試験例1-1	17, 20, 40, 45	8.0
試験例1-2	15, 17, 21, 29, 45	10.0
比較試験例1-1	17, 22, 45	6.0
比較試験例1-2	30, 34, 45	6.0

[0089] 表4より、比較試験例1-1及び比較試験例1-2と比べて、試験例1-1及び試験例1-2の結晶化成功率は大きいことが分かる。これは、フッ素原子と水酸基とを有するサポナイトが、リゾチームの結晶化条件の探索において結晶化成功率を向上させることを示す。

この現象は、フッ素原子と水酸基とを有するサポナイトが、結晶核として作用するリゾチームの凝集体を効率的に形成する場として機能したことに起因すると考えられる。

[0090] 表4において、試験例1-1は、比較試験例1-2において結晶化しない3つの沈殿剤溶液（番号17、番号20及び番号40）で結晶を形成することが分かる。表4において、試験例1-2は、比較試験例1-2において結晶化しない4つの沈殿剤溶液（番号15、番号17、番号21及び番号29）で結晶を形成することが分かる。このことから、フッ素原子と水酸基とを有するサポナイトを第1次スクリーニングに用いることによって、サポナイト非存在下において発見されない結晶化開始条件を発見することができる。表4において、試験例1-1は、比較試験例1-1において結晶化しない2つの沈殿剤溶液（番号20及び番号40）で結晶を形成することが分かる。表4において、試験例1-2は、比較試験例1-1において結晶化しない3つの沈殿剤溶液（番号15、番号21及び番号29）で結晶を形成することが分かる。このことから、フッ素原子と水酸基とを有するサポナイトを第1次スクリーニングに用いることによって、フッ素原子を含まないサポナイトの存在下において発見されない結晶化開始条件を見いだすことができる。

[0091] なお、表4において、試験例1-1及び試験例1-2は、比較試験例1-2において結晶化した2つの沈殿剤溶液（番号30及び番号34）で結晶を形成しないことが分かる。これは、サポナイトの添加に伴いリゾチームが吸着し、ドロップ内の過飽和度が著しく低下したことが原因であると考えられる。

[0092] （実施例2）サポナイトのリゾチーム結晶成長に対する影響
試験例2-1

鶏卵白リゾチームのX線回折測定用の結晶を得ることを目的に調製例1のサポナイトの分散液を適用した。分散液は、クライオプロテクタントを含む。所定の濃度のリゾチーム溶液及び分散液を用い、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。

[0093] クライオプロテクタントを含む沈殿剤溶液として、1.2 mol/L塩化ナトリウム及び30% (w/v)グリセロールを含む0.2 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.7) を作製した。

タンパク質溶液として、鶏卵白リゾチーム (和光純薬工業株) 製) を0.020 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.7) に溶解し、55 mg/mLリゾチーム溶液を調製した。

クライオプロテクタントを含む沈殿剤溶液を用い、調製例1のサポナイトを0.2% (w/v) の濃度で分散させた分散液を調製した。

[0094] ハンギングドロップのセットアップに際し、シリコンコーティング処理を施したカバーガラス (松浪硝子工業 (株) 製) 上でリゾチーム溶液5 μ Lと分散液5 μ Lとを混合した。24ウェルプレート (TPP社製) のウェルにクライオプロテクタントを含む沈殿剤溶液を400 μ L添加した。カバーガラスを逆さの状態にして、高真空グリース (ダウコーニング・東レ (株) 製) によりウェルを密封し、20 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cで1ヶ月静置した。

[0095] リゾチーム結晶のX線回折データは、高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所、放射光科学研究施設 (Photon Factory) のビームラインBL6Aステーションにおいて収集された。サポナイトを含むドロップから、結晶凍結用のマウントループ (ハンプトンリサーチ社製、クライオループ) を用いて、サポナイトを付着している結晶をすくった。結晶を-173 $^{\circ}$ Cの窒素気流中にて冷却し、波長0.97800 $\text{\AA}$ の放射光X線を照射した。CDカメラで取得されたX線回折像は、プログラムパッケージソフトであるDPS/MOSFLMを用いて解析した。

[0096] 試験例2-2

試験例2-1において調製例1のサポナイトの代わりに調製例2のサポナ

イトを使用したこと以外は、試験例 5 - 1 と同じ方法で試験した。

[0097] 比較試験例 2 - 1

調製例 1 のサポナイトの代わりに調製例 3 のサポナイトを使用したこと以外は、試験例 2 - 1 と同じ方法で試験した。

[0098] 比較試験例 2 - 2

試験例 2 - 1 において調製例 1 のサポナイトを 0.2% (w/v) の濃度で分散させた分散液を使用する代わりに、サポナイトを添加していない沈殿剤溶液を使用したこと以外は、試験例 2 - 1 と同じ方法で試験した。

[0099] 試験例 2 - 1、試験例 2 - 2、比較試験例 2 - 1 及び比較試験例 2 - 2 の結果を表 5 に示す。

[0100] [表5]

表5

	試験例 2-1	試験例 2-2	比較試験例 2-1	比較試験例 2-2
結晶化温度 (K)	293	293	293	293
回折データ収集温度 (K)	100	100	100	100
空間群	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
単位格子定数 (Å)	a=b=78.365, c=36.929	a=b=78.647, c=36.903	a=b=78.594, c=36.908	a=b=78.498, c=36.913
波長 (Å)	0.97800	0.97800	0.97800	0.97800
分解能 (Å)	50.00 - 1.19	50.00 - 1.19	50.00 - 1.19	50.00 - 1.19
全反射数	238588	234129	370989	475498
ユニークな反射数	37470	37716	37660	37625
モザイシティ範囲	0.75 - 1.29	0.15 - 0.17	0.38 - 0.66	0.38 - 0.53
完全性 (%)	92.2	97.3	96	97.8
R-merge	0.069	0.044	0.058	0.053
平均 I/Sigma	21.126	33.678	33.651	37.236

[0101] いずれの試験例及び比較試験例も、形成した結晶の空間群及び単位格子定数が同じであることが分かる。これは、サポナイトがリゾチームの結晶の空間群及び単位格子定数に影響を与えないことを示す。比較試験例 2 - 2 と比べて、試験例 2 - 2 のモザイシティ範囲は小さいことが分かる。更に、試験例 2 - 2 の完全性は、比較試験例 2 - 2 とほぼ同一であることが分かる。これらの結果は、試験例 2 - 2 のサポナイトがリゾチームの結晶成長に悪影響を及ぼさず、高品質な結晶を形成することを示す。以上より、結晶化条件の探索における第 2 次スクリーニング工程において、本結晶化条件探索剤を添加しても、タンパク質結晶の X 線回折データを取得することが可能であることがわかる。

[0102] (実施例3) 各種タンパク質溶液(分散液)からのタンパク質の結晶化における結晶化条件探索剤の影響

試験例3-1

11種類のタンパク質におけるそれぞれのタンパク質の結晶化条件の探索例として調製例1のサポナイトの分散液を適用した。所定濃度のそれぞれのタンパク質溶液及び分散液を用い、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。

[0103] ウシ肝臓カタラーゼ、*Tritirachium album*由来プロテイナーゼK及びウシ膵臓トリプシンは和光純薬工業株式会社から購入した。ナタ豆由来コンカナバリンA、アプロチニン、*Thaumatococcus daniellii*由来ソーマチン及びヒト血清アルブミンはシグマアルドリッチジャパン株式会社から購入した。*Streptomyces rubiginosus*由来グルコースイソメラーゼ及び*Trichoderma longibrachiatum*由来キシラナーゼはハンプトンリサーチ社から購入した。卵白由来アビジンはナカライテスク株式会社から購入した。以上のタンパク質は、精製せずに結晶化を行った。*Thermus caldophilus* GK24由来L-乳酸脱水素酵素は、先行技術文献(Koide S. et al., "Crystallization of Allosteric L-Lactate Dehydrogenase from *Thermus caldophilus* and Preliminary Crystallographic Data", *The Journal of Biochemistry*, 1991, 109, p.6-7.) に従って大腸菌発現系により発現させ精製した。

[0104] 各タンパク質溶液からの結晶化条件を表6A、6B及び6Cに示す。表6Aは、各タンパク質の結晶化に用いた各タンパク質溶液の組成を示す。表6Bは、各タンパク質の結晶化に用いた各沈殿剤溶液の組成を示す。表6Cは、各タンパク質の結晶化に用いた各リザーバー溶液の組成を示す。

[0105]

〔表6A〕

表6A

タンパク質	タンパク質溶液条件					
	タンパク質濃度	pH緩衝液		添加剤1		添加剤2
アルブミン	100 mg/mL	50 mmol/L	リン酸カリウム pH 5.0	—	—	—
アブロチニン	28 mg/mL	50 mmol/L	酢酸ナトリウム pH 4.5	—	—	—
アビジン	9.0 mg/mL	50 mmol/L	リン酸ナトリウム pH 5.7	0.75 mmol/L	ビオチン	—
カタラーゼ	15 mg/mL	20 mmol/L	トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩化水素 pH 8.5	—	—	—
コンカナリジンA	8.0 mg/mL	20 mmol/L	クエン酸ナトリウム pH 5.8	—	—	—
グルコースイソメラーゼ	15 mg/mL	20 mmol/L	トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩化水素 pH 7.0	1.0 mmol/L	塩化マグネシウム	—
L-乳酸脱水素酵素	16 mg/mL	5.0 mmol/L	4-モルフォリンプロピルンスルホン酸 pH 7.2	50 mmol/L	塩化ナトリウム	—
ブロティナーゼK	10 mg/mL	25 mmol/L	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタン硫酸 pH 7.0	2.0 mmol/L	フッ化フェニルメチルスルホニル	—
ソーマチン	5.0 mg/mL	20 mmol/L	ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) pH 6.8	—	—	—
トリプシン	15 mg/mL	25 mmol/L	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタン硫酸 pH 7.0	10 mmol/L	塩化カリウム	2.5 mg/mL
キシラナーゼ	15 mg/mL	10 mmol/L	N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン pH 9.0	1.0 mmol/L	硫酸マグネシウム	1.0 mmol/L

〔0106〕〔表6B〕

表6B

タンパク質	沈殿剤溶液条件			
	pH緩衝液		沈殿剤	添加剤
アルブミン	50 mmol/L	リン酸カリウム pH 5.0	40% v/v	ポリエチレングリコール400
アブロチニン	50 mmol/L	酢酸ナトリウム pH 4.5	2.8 mol/L	塩化ナトリウム
アビジン	50 mmol/L	リン酸ナトリウム pH 5.7	3.0 mol/L	硫酸アンモニウム
カタラーゼ	100 mmol/L	トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩化水素 pH 8.5	8.0% w/v	ポリエチレングリコール4000
コンカナリジンA	200 mmol/L	クエン酸ナトリウム pH 5.8	1.0 mol/L	硫酸アンモニウム
グルコースイソメラーゼ	100 mmol/L	トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩化水素 pH 7.0	15% v/v	2-メチル-2,4-ペンタジオール
L-乳酸脱水素酵素	50 mmol/L	4-モルフォリンプロピルンスルホン酸 pH 7.0	6.0% w/v	ポリエチレングリコール6000
ブロティナーゼK	100 mmol/L	トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩化水素 pH 8.5	800 mmol/L	硫酸アンモニウム
ソーマチン	200 mmol/L	ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) pH 6.8	600 mmol/L	酒石酸ナトリウムカリウム
トリプシン	25 mmol/L	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタン硫酸 pH 7.0	20% w/v	ポリエチレングリコール8000
キシラナーゼ	50 mmol/L	N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン pH 9.0	250 mmol/L	硫酸アンモニウム

〔0107〕〔表6C〕

表6C

タンパク質	リザーバー溶液条件			
	pH緩衝液		沈殿剤	添加剤
アルブミン	50 mmol/L	リン酸カリウム pH 5.0	40% v/v	ポリエチレングリコール400
アブロチニン	50 mmol/L	酢酸ナトリウム pH 4.5	1.9 mol/L	塩化ナトリウム
アビジン	50 mmol/L	リン酸ナトリウム pH 5.7	2.75 mol/L	硫酸アンモニウム
カタラーゼ	100 mmol/L	トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩化水素 pH 8.5	8.0% w/v	ポリエチレングリコール4000
コンカナリジンA	200 mmol/L	クエン酸ナトリウム pH 5.8	1.0 mol/L	硫酸アンモニウム
グルコースイソメラーゼ	100 mmol/L	トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩化水素 pH 7.0	15% v/v	2-メチル-2,4-ペンタジオール
L-乳酸脱水素酵素	50 mmol/L	4-モルフォリンプロピルンスルホン酸 pH 7.0	6.0% w/v	ポリエチレングリコール6000
ブロティナーゼK	100 mmol/L	トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩化水素 pH 8.5	800 mmol/L	硫酸アンモニウム
ソーマチン	200 mmol/L	ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) pH 6.8	600 mmol/L	酒石酸ナトリウムカリウム
トリプシン	25 mmol/L	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタン硫酸 pH 7.0	20% w/v	ポリエチレングリコール8000
キシラナーゼ	50 mmol/L	N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン pH 9.0	450 mmol/L	硫酸アンモニウム

〔0108〕 各タンパク質の結晶化に際し、表6Aに記載された各タンパク質溶液、表6Bに記載された各沈殿剤溶液及び表6Cに記載された各リザーバー溶液をそれぞれ作製した。

沈殿剤溶液を用い、調製例1のサポナイトを0.2% (w/v) の濃度で分散させた分散液を調製した。

〔0109〕 ハンギングドロップのセットアップに際し、シリコンコーティング処理を施したカバーガラス（松浪硝子工業（株）製）上でタンパク質溶液5 μ Lと

分散液 5 μL とを混合した。24 ウェルプレート（TPP 社製）のウェルにリザーバー溶液を 400 μL 添加した。カバーガラスを逆さの状態にして、高真空グリース（ダウコーニング・東レ（株）製）によりウェルを密封し、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で 2 ヶ月静置した。

[0110] 形成した結晶を、結晶形成時間により評価した。結晶形成時間は、偏光顕微鏡観察下（倍率 40 倍）で最初の結晶が現れるまで、すなわち、10 μm ～ 20 μm 程度の結晶が現れるまでの経過時間（日数）と定義した。

[0111] 試験例 3-2

試験例 3-1 において調製例 1 のサポナイトの代わりに調製例 2 のサポナイトを使用したこと以外は、試験例 3-1 と同じ方法で試験した。

[0112] 比較試験例 3-1

試験例 3-1 において調製例 1 のサポナイトの代わりに調製例 3 のサポナイトを使用したこと以外は、試験例 3-1 と同じ方法で試験した。

[0113] 比較試験例 3-2

試験例 3-1 において調製例 1 のサポナイトを 0.2% (w/v) の濃度で分散させた分散液を使用する代わりに、サポナイトを添加していない沈殿剤溶液を使用したこと以外は、試験例 3-1 と同じ方法で試験した。

[0114] 試験例 3-1、試験例 3-2、比較試験例 3-1 及び比較試験例 3-2 の各タンパク質溶液からの結晶形成時間を表 7 に示す。表 9 に記載された数値は、最初の結晶が観察された日数（単位：日）を示す。表 7 に記載された N.C. は、2 ヶ月静置後に結晶が形成しないことを示す。

[0115]

[表7]

表7

	試験例 3-1	試験例 3-2	比較試験例 3-1	比較試験例 3-2
アルブミン	14	19	26	N.C.
アプロチニン	2	7	7	7
アビジン	1	5	5	5
カタラーゼ	5	8	8	12
コンカナバリンA	13	20	26	26
グルコースイソメラーゼ	2	2	N.C.	N.C.
L-乳酸脱水素酵素	5	8	N.C.	N.C.
プロテイナーゼK	8	N.C.	N.C.	N.C.
ソーマチン	25	12	28	55
トリプシン	34	43	42	N.C.
キシラナーゼ	2	9	9	8

[0116] 表7のアルブミン、グルコースイソメラーゼ、L-乳酸脱水素酵素及びトリプシンのそれぞれの結晶化において、比較試験例3-2は結晶を形成しないのに対し、試験例3-1及び試験例3-2は結晶を形成することが分かる。表7のプロテイナーゼKの結晶化において、比較試験例3-2は結晶を形成しないのに対し、試験例3-1は結晶を形成することが分かる。アプロチニン、アビジン、カタラーゼ、コンカナバリンA、ソーマチン及びキシラナーゼの結晶化において、比較試験例3-2と比べて、試験例3-1及び試験例3-2は結晶形成時間を促進することが分かる。これらの結果は、フッ素原子と水酸基とを有するサポナイトが、各タンパク質溶液からのタンパク質の結晶形成時間を促進することを示す。よって、第2次スクリーニングにおいて、フッ素原子と水酸基とを有するサポナイトを添加したり、添加するサポナイトのフッ素置換率を変更したりすることによって、所望の結晶形成時間となるように結晶化開始条件を改変することができる。

この現象は、フッ素原子と水酸基とを有するサポナイトが、結晶核として作用するタンパク質の凝集体を効率的に形成する場として機能したことに起因すると考えられる。

[0117] 表7のアルブミン及びトリプシンのそれぞれの結晶化において、比較試験例3-2は結晶を形成しないのに対し、比較試験例3-1は結晶を形成することが分かる。カタラーゼ及びソーマチンのそれぞれの結晶化において、比

較試験例 3-2 と比べて、比較試験例 3-1 は結晶形成時間を促進することが分かる。これらの結果は、水酸基を有するサポナイトが、各タンパク質溶液からタンパク質の結晶化を促進することを示す。

この現象は、水酸基を有するサポナイトが、結晶核として作用するタンパク質の凝集体を形成する場として機能したことに起因すると考えられる。

[0118] 表 7 のグルコースイソメラーゼ及び L-乳酸脱水素酵素それぞれの結晶化において、比較試験例 3-1 は結晶を形成しないのに対し、試験例 3-1 及び試験例 3-2 は結晶を形成することが分かる。表 7 のプロテイナーゼ K の結晶化において、比較試験例 3-1 は結晶を形成しないのに対し、試験例 3-1 は結晶を形成することが分かる。これは、各タンパク質溶液からの各タンパク質の結晶化促進にサポナイトのフッ素原子の存在が重要であることを示す。よって、第 2 次スクリーニングにおいて、フッ素原子と水酸基とを有するサポナイトを添加することによって、準安定領域でグルコースイソメラーゼ及び L-乳酸脱水素酵素を結晶化させることができる。

[0119] 表 7 のアルブミン、コンカナバリン A 及びソーマチンの各タンパク質溶液からの各タンパク質の結晶化において、比較試験例 3-1 と比べて、試験例 3-1 及び試験例 3-2 では結晶形成時間が顕著に促進されたことが分かる。これは、同形置換によるフッ素原子の導入が、水酸基を有するサポナイトの結晶化促進効果を高めることを示す。

[0120] 表 7 のプロテイナーゼ K の結晶化において、試験例 3-2 は結晶を形成しないのに対し、試験例 3-1 は結晶を形成することが分かる。これは、プロテイナーゼ K の結晶化促進に、より多いフッ素原子の含有が好適であることを示す。よって、第 2 次スクリーニングにおいて、フッ素原子のモル比率の高いサポナイトを添加することによって、準安定領域でプロテイナーゼ K を結晶化させることができる。

[0121] 表 7 のソーマチンの結晶化において、試験例 3-1 と比べて、試験例 3-2 は結晶形成時間を促進することが分かる。これは、ソーマチンの結晶化の促進に調製例 2 のサポナイトのフッ素原子と水酸基とのモル比率が好適であ

ることを示す。

[0122] 以上の結果より、準安定領域を含む既存の結晶化条件において結晶化できなかった溶液条件下においても本結晶化条件探索剤を使用することで結晶化の可能性が大幅に向上することがわかる。また、本結晶化条件探索剤は結晶化速度の促進を行うが、速度の促進のみで結晶化を成功させているのではなく、効果的にタンパク質に結晶核を作る場を与え、結晶化させる効果を付与している。さらに本発明の結晶化条件の探索法を用いることで、比較的負荷の少ない条件検討のみで結晶化条件を決定することができることは容易に予想できる。

[0123] なお、「発明を実施するための形態」において引用した全ての文書は、関連する部分において、参照として本明細書に組み込まれるが、いかなる文書の引用も、本発明に関する先行技術であることの容認と考えるべきではない。

[0124] 本発明をその実施態様とともに説明したが、我々は特に指定しない限り我々の発明を説明のどの細部においても限定しようとするものではなく、添付の請求の範囲に示した発明の精神と範囲に反することなく幅広く解釈されるべきであると考ええる。

[0125] 本願は、2011年3月31日に日本国で特許出願された特願2011-080944に基づく優先権を主張するものであり、これはここに参照してその内容を本明細書の記載の一部として取り込む。

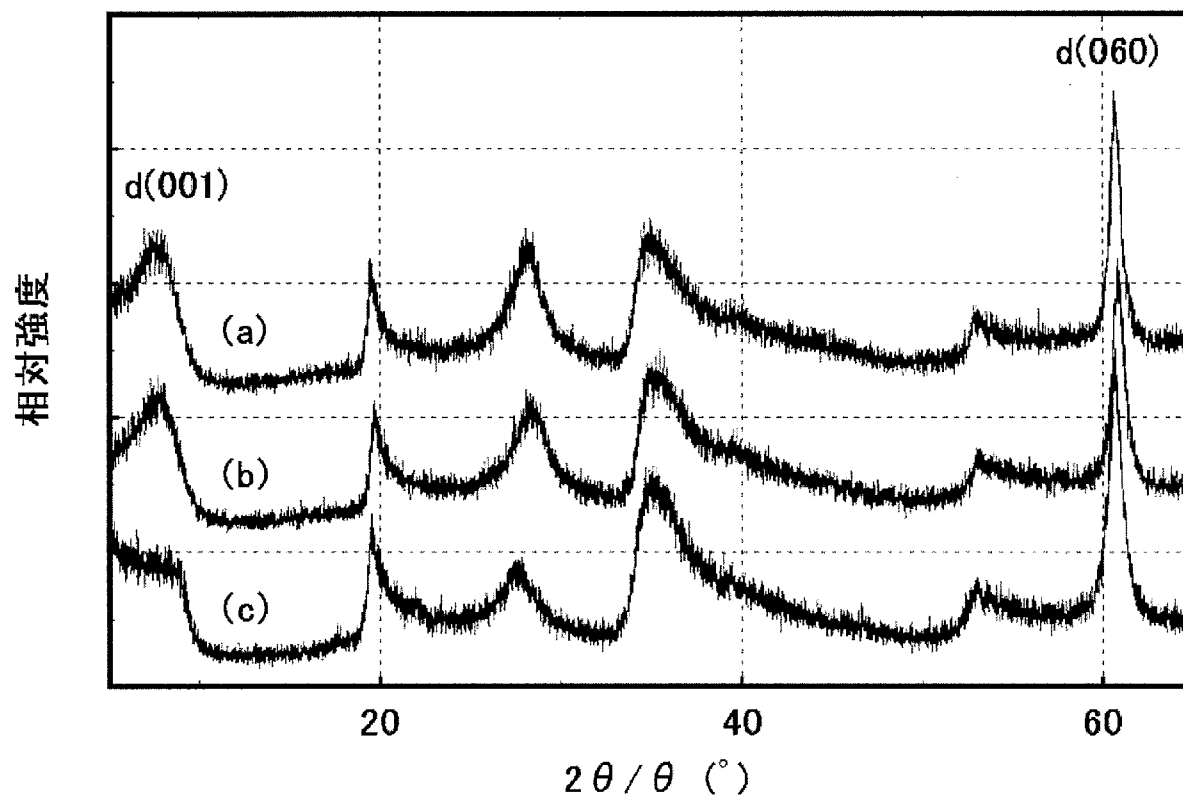
請求の範囲

- [請求項1] フッ素原子と水酸基とを有する水膨潤性層状ケイ酸塩を含み、前記フッ素原子は水酸基との同形置換により前記ケイ酸塩に共有結合していることを特徴とする、タンパク質結晶化条件探索剤。
- [請求項2] 前記フッ素原子と水酸基とのモル比率がそれぞれ3%～15%、85%～97%である、請求項1に記載のタンパク質結晶化条件探索剤。
- [請求項3] 前記フッ素原子と水酸基とのモル比率がそれぞれ4%～12%、88%～96%である、請求項2に記載のタンパク質結晶化条件探索剤。
- [請求項4] 前記ケイ酸塩がスメクタイトである、請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質結晶化条件探索剤。
- [請求項5] 前記ケイ酸塩がサポナイトである、請求項4に記載のタンパク質結晶化条件探索剤。
- [請求項6] 分散液剤である、請求項1～5のいずれか一項に記載のタンパク質結晶化条件探索剤。
- [請求項7] 固形剤である、請求項1～5のいずれか一項に記載のタンパク質結晶化条件探索剤。
- [請求項8] 前記固形剤が支持体上に塗布した薄膜である、請求項7に記載のタンパク質結晶化条件探索剤。
- [請求項9] 前記支持体がカバーガラス、スライドガラス、プレート、ブリッジ又はロッドである請求項8に記載のタンパク質結晶化条件探索剤。
- [請求項10] ナノグラム単位からマイクログラム単位までの量のタンパク質の結晶化条件を探索するための結晶化条件探索剤である、請求項1～9のいずれか一項に記載のタンパク質結晶化条件探索剤。
- [請求項11] 遺伝子組換え技術により合成した発現タンパク質の結晶化条件を探索するための結晶化条件探索剤である、請求項1～10のいずれか一項に記載のタンパク質結晶化条件探索剤。

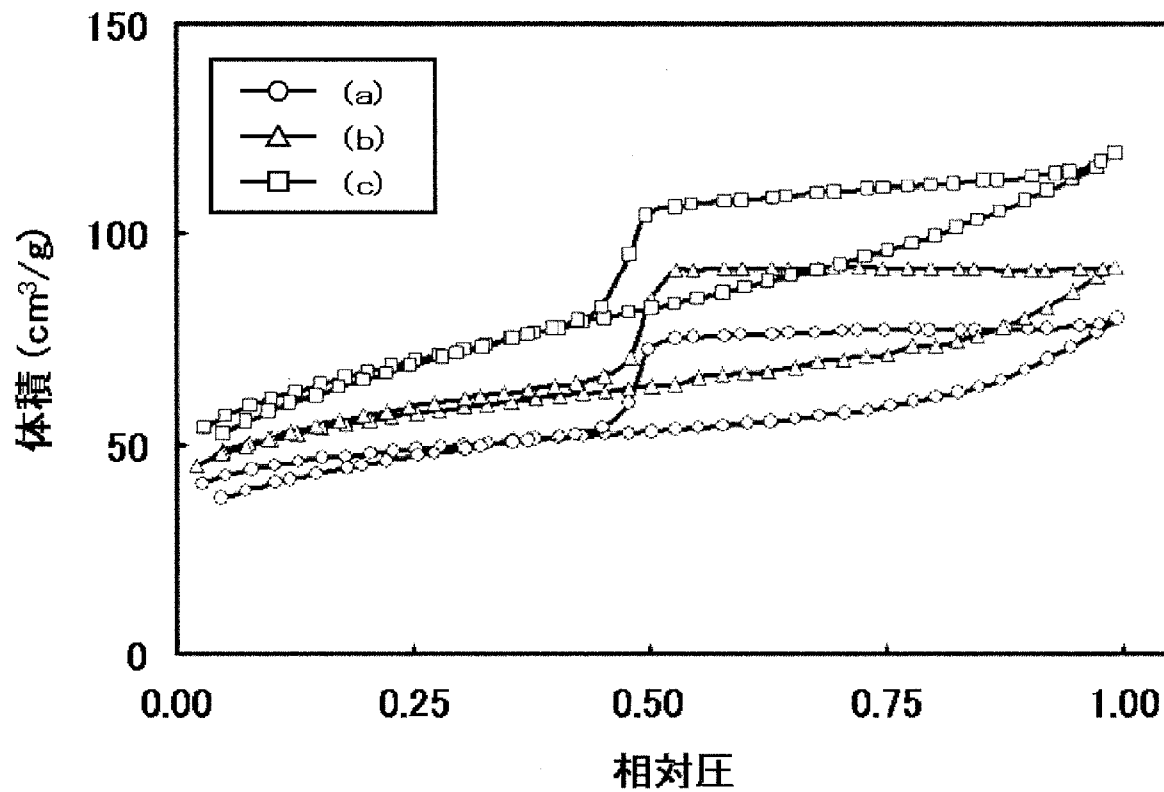
[請求項12] 請求項1～11のいずれか一項に記載のタンパク質結晶化条件探索剤とタンパク質が溶解している溶液とを混合する工程を含む、タンパク質結晶化条件探索方法。

[請求項13] 請求項1～11のいずれか一項に記載のタンパク質結晶化条件探索剤とタンパク質が溶解している溶液とを混合し、結晶化タンパク質を回収する請求項1～11のいずれか一項に記載のタンパク質結晶化条件探索剤の使用。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/058451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C30B29/58 (2006.01) i, C07K1/30 (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)

C30B29/58, C07K1/30

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

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

JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Itsumi UTADA, Keita INO et al., "Fussoka Saponite ni yoru Tanpakushitsu Kesshokaku Keisei no Sokushin", Journal of Japanese Biochemical Society, 2010, 3P-0245	1, 5, 10, 12, 13 2-4, 6-9, 11,
A	JP 2010-028124 A (Japan Science and Technology Agency), 04 February 2010 (04.02.2010), entire text & JP 2005-322892 A	1-13
A	JP 2005-350294 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 22 December 2005 (22.12.2005), entire text (Family: none)	1-13

☒ 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
28 May, 2012 (28.05.12)Date of mailing of the international search report
05 June, 2012 (05.06.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/058451

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-343856 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 15 December 2005 (15.12.2005), entire text (Family: none)	1-13
P,X	JP 2011-121789 A (Kunimine Industries Co., Ltd.), 23 June 2011 (23.06.2011), entire text (Family: none)	1-3, 5-7, 10, 12, 13
P,A		4, 8, 9, 11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C30B29/58 (2006.01)i, C07K1/30 (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 (I P C))

Int.Cl. C30B29/58, C07K1/30

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 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 (JDreamII)

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 A	宇田川いつみ、稲生溪太、他 1 1 名、フッ素化サポナイトによるタンパク質結晶核形成の促進、生化学、2010、3P-0245	1, 5, 10, 12, 13 2-4, 6-9, 11,
A	JP 2010-028124 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2010.02.04, 全文 & JP 2005-322892 A	1-13
A	JP 2005-350294 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2005.12.22, 全文 (ファミリーなし)	1-13

☒ 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

2 8 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 6 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

亀代 陽子

4 G

3 9 4 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 1 6

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
A	JP 2005-343856 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2005. 12. 15, 全文 (ファミリーなし)	1-13
P, X	JP 2011-121789 A (クニミネ工業株式会社) 2011. 06. 23, 全文 (ファミリーなし)	1-3, 5-7, 10, 12, 13
P, A		4, 8, 9, 11