



Title	有機およびタンパク質結晶の育成とその応用に関する研究
Author(s)	安達, 宏昭
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1530
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

有機およびタンパク質結晶の 育成とその応用に関する研究

2003 年 2 月

安 達 宏 昭

内容梗概

本論文は、著者が大阪大学大学院工学研究科電気工学専攻において実施した、有機非線形光学結晶 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST)の育成とその電気光学素子応用に向けた電気光学評価、およびタンパク質結晶の育成に関する研究成果をまとめたものである。論文は、以下の6章より構成される。

第1章 序論

本論文に関する研究分野について概観し、本研究の意義と目的を明らかにした。

第2章 有機非線形光学結晶 DAST の育成

本章では、有機非線形光学結晶 DAST の物理・化学的性質、結晶構造などを説明し、その合成法と結晶育成法について述べた。種結晶による DAST 結晶の育成において、結晶成長速度と結晶品質が強く関連していることを明らかにした。一方、自然核成長からの育成である Slope Nucleation 法において、4つの改善を行うことで高品質 DAST 結晶の育成が可能となった。

第3章 DAST の電気光学素子への応用

本章では、DAST の電気光学素子への応用として電界センサーに着目し、電気光学プロービングによる電気光学特性評価について述べた。DAST は従来の電気光学結晶を凌駕する高感度性と広帯域周波数応答特性に優れていることを実証し、その電気光学特性を明らかにした。

第4章 2液界面におけるタンパク質結晶の育成

本章では、比重差と不溶性を利用したタンパク質結晶の新しい育成法(Two-Liquid System)を提案し、その有効性について述べた。有機結晶 DAST の育成技術をタンパク質結晶に応用し、温度降下法と Two-Liquid System を組み合わせることにより、高品質および大型タンパク質結晶の育成手法を確立できる可能性を示した。また、Two-Liquid System はタンパク質結晶の育成において最も一般的な蒸気拡散法への応用が可能であることを示し、その優れた特長を明らかにした。

第5章 溶液攪拌によるタンパク質結晶の育成

本章では、従来のタンパク質結晶の育成において、有害無益とされてきた溶液攪拌による結晶育成について述べた。溶液攪拌をタンパク質結晶の育成に適用するため、新しい溶液攪拌法(FAST)を提案し、その有効性と溶液攪拌の効果を明らかにした。また、FAST により大型タンパク質結晶を高速育成できることを実証し、溶液攪拌が必要であることを示した。

第6章 結論

本章では、研究全体の総括を行い、結論とした。

—目次—

第 1 章 序論	1
1.1 研究の背景と目的	1
1.2 論文の構成	3
参考文献	4
第 2 章 有機非線形光学結晶 DAST の育成	7
2.1 はじめに	7
2.2 DAST の材料特性と結晶構造	7
2.3 DAST の合成	9
2.4 種結晶による DAST 結晶の育成と評価	10
2.5 Slope Nucleation 法による DAST 結晶の育成と評価	17
2.6 まとめ	25
参考文献	27
第 3 章 DAST の電気光学素子への応用	29
3.1 はじめに	29
3.2 電気光学結晶を用いた電界センサー	29
3.2.1 電界センサーの基本原理	29
3.2.2 電気光学プロービングによる電界計測	32
3.2.3 電気光学結晶	33
3.3 DAST の電気光学特性	34
3.4 反射型測定系を用いた DAST の電気光学評価	36
3.4.1 電気光学感度評価	36
3.4.2 周波数特性評価	40
3.4.3 高速電気信号の電気光学測定	41
3.5 透過型測定系を用いた DAST の電気光学評価	43
3.5.1 電気光学プロービングによる結晶品質評価	44
3.5.2 結晶厚と電気光学感度	46
3.5.3 広帯域信号の電気光学測定	47
3.6 まとめ	49
参考文献	50

第4章 2液界面におけるタンパク質結晶の育成	53
4.1 はじめに	53
4.2 タンパク質の結晶育成法	54
4.2.1 従来の結晶育成法	55
4.2.2 2液界面における結晶育成法 (Two-Liquid System)	57
4.3 温度降下法によるタンパク質結晶の育成	59
4.3.1 自然核成長による結晶育成	59
4.3.2 種結晶による大型結晶の育成	62
4.4 蒸気拡散法によるタンパク質結晶の育成	65
4.5 まとめ	70
参考文献	71
 第5章 溶液攪拌によるタンパク質結晶の育成	 73
5.1 はじめに	73
5.2 攪拌方法 (FAST)	74
5.3 溶液攪拌の効果	75
5.4 溶液攪拌による大型タンパク質結晶の育成	77
5.5 まとめ	80
参考文献	81
 第6章 結論	 83
6.1 はじめに	83
6.2 本研究で得られた成果	83
6.3 将来の展望	87
 謝辞	 89
研究業績	91

第 1 章

序論

1.1 研究の背景と目的

現在の高度情報化社会を支える基盤に結晶成長における研究の産物がある。シリコン、ゲルマニウムをはじめとするエレクトロニクス素子や化合物半導体によるレーザー、ダイオードなどのオプトエレクトロニクス素子は、その例で、産業の米ともいわれている。オプトエレクトロニクス結晶と称される光学結晶は、光との強い相互作用をもち、固体レーザーの出現とともに注目されるようになった。今日までに数多くの光学結晶が開発され、実用化に至っているが、その大半が無機系の酸化物光学結晶である[1-3]。無機系の材料は結晶育成が比較的容易であり、単結晶育成技術の確立とともに、大型高品質結晶の育成が可能となった[4-6]。また、高い硬度を有していることから、産業応用に適している。しかしながら、次世代の超高速・大容量を実現する光情報通信デバイスなどに求められる応答性や感度・効率などの性能は、無機結晶の性能限界を超えろといわれ、高速応答・高感度・高効率などの優れた特性を有する新しい光学材料が求められている。そこで注目されているのが、有機系の光学結晶である。

有機光学材料は無機材料をはるかに凌ぐ非線形感受率を有しており、2-methyl-4-nitroaniline (MNA)[7]が報告されて以来、有機化合物の非線形光学が盛んに研究されるようになった[8-15]。有機系材料の光非線形性の起源は、分子内 π 電子である[16,17]。無機材料では、原子、イオン、分子イオン間の化学結合に関わる電子が光に反応する(励起される)。従って、光の照射によって励起された電子は、主に格子振動を通じて緩和(つまり、反応時間)するため、ピコ(10^{-12})秒より高速の応答は困難である[18]。一方、有機 π 電子系では、基本的には格子振動を伴わず、非局在化した π 電子の応答が寄与しているため、より高速の応答が可能である(例、MNA の場合は 10^{-14} 秒[16])。しかしながら、有機材料は無機材料に比べて、優れた非線形特性や高速応答を有するが、機械的強度、安定性、結晶育成の難しさなどの問題から実用化の域には達していないのが現状である。有機結晶のうち、著者が以前研究を行っていた有機イオン性結晶 L-Arginine Phosphate Monohydrate (LAP) [19]は、イオン結合に起因する比較的高い硬度(ビッカース硬度: 56)を有し、汎用機による結晶表面研磨などのデバイス加工が可能であり、かつ、結晶育成も比較的容易なこと

第1章 序論

から、大型高品質結晶が得られている[20-23]。しかしながら、LAP は非線形性が小さいことから、次世代光学素子応用には適さない[24,25]。そのため、新しい有機イオン性材料の開発が求められている。

一方、生命科学分野においても、結晶成長は非常に重要である。特に、タンパク質結晶の育成が全世界的に盛んになってきている。日米欧などの国際プロジェクトなどにより進められてきたヒトゲノム（人間の全遺伝情報）解読がほぼ終了し、プロテオーム（タンパク質研究）を代表とするポストゲノム時代に突入したからである。その中で、特に注目されているのが構造ゲノム科学と呼ばれるタンパク質の3次元構造を解き明かそうとする研究であり、その構造解析結果は、病気の治療や創薬に直結するといわれている。タンパク質の詳細な立体構造は、主に単結晶を用いたX線構造解析により決定することができる[26-29]。X線構造解析では、タンパク質結晶の品質により最終的に得られる立体構造の精度が決まるため、高品質な結晶が必要である。1960年頃に初めてM.F. Perutzがヘモグロビンの、J.C. KendrewがミオグロビンのX線結晶構造解析に成功した（1962年に2人とも、その業績でノーベル化学賞を受賞）。現在では、欧米の生命科学関連の学術雑誌に毎号のようにタンパク質をはじめとする生体高分子の立体構造に関する研究成果が発表され、魅力的な分子構造が雑誌の表紙を飾っている。また、“Acta Crystallographica Section D”（1993年1月、International Union of Crystallography）、“Structure”（1993年9月、Current Biology）、“Nature Structure Biology”（1994年1月、Nature Publishing Group）など、主に新しい生体分子の構造を掲載する専門誌が相次いで創刊されている。日本では、今年度から新薬開発を目標に5年間でタンパク質の全基本構造の約1/3に相当する3000種以上の解析を目的とした「タンパク3000プロジェクト」（文部科学省）が発足し、5000種以上を目標とする米国などとの国際的な構造解析競争が激化している。

タンパク質の結晶は、無機結晶や低分子性の有機化合物の結晶と異なり、分子構造が複雑かつ巨大であり、分子間の相互作用が弱く、その間を多くの水分子が占有できるため、3次元規則性に大きな乱れ（結晶の不完全性）がある場合が多く、あまり大きく成長することがない[30-32]。そのため、タンパク質結晶の育成は、無機や有機の結晶育成と比べてはるかに難しく、高品質および大型結晶が得られにくい。特に、タンパク質複合体などの巨大分子の構造解析や水素原子位置決定に必要な高分解能データ収集、中性子線回折解析には、育成が極めて困難な 1 mm^3 以上の大型タンパク質結晶が必要なことから、それらの解析例は少ない。このようにタンパク質の構造解析において、目的とするタンパク質結晶の作製がボトルネックとなっており、高品質および大型タンパク質結晶の育成技術開発が求められている[33]。

本論文では、有機イオン性材料の中でも特に優れた非線形特性を有するといわれる4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST) [34,35]に着目し、その実用化を最終目標に定め、高品質結晶の育成と電気光学素子応用に向けた電気光学評価についての研究成果をまとめる。DAST結晶に関する研究の主たる目的は、素子応用に適した品質を有する高品質DAST結晶の育成技術を確認すること、そして、従来使用されてきた無機非線形光学結晶とDAST結晶との

電気光学特性を比較し、次世代電気光学素子への可能性を検討することである。また、金属や半導体、酸化物などを対象として発展してきた結晶成長に関する諸概念が、タンパク質の場合にも適用できることが、徐々に明らかになってきている[36-48]。そのため、著者が有機非線形光学結晶 DAST の育成で得た知見・経験を、より結晶育成が困難であるタンパク質へ応用することにより、構造解析において必要とされる高品質および大型タンパク質結晶の育成技術の確立を目指す。本論文の後半部分において、タンパク質結晶の育成についての研究成果をまとめる。

以上のように、本研究はこれらの結果を基に、難結晶育成材料である有機およびタンパク質の結晶育成に関する新しい概念を示し、工学および生命科学分野で求められる高品質および大型結晶の作製とその実用化に貢献することを目的とする。

1.2 論文の構成

本論文は、第1章序論を含めて本文6章と謝辞、研究業績リストより構成されている。前節で述べたように有機非線形光学結晶 DAST に関する研究（第2章、第3章）と、タンパク質結晶に関する研究（第4章、第5章）の2つに大別できる。図1.1に本論文の構成と各章のつながりを図式化した。

第2章では、有機非線形光学結晶 DAST の物理・化学的性質、結晶構造などを説明し、その合成法を示した後、温度降下法を用いた種結晶による DAST 結晶の育成と自然核成長からの育成

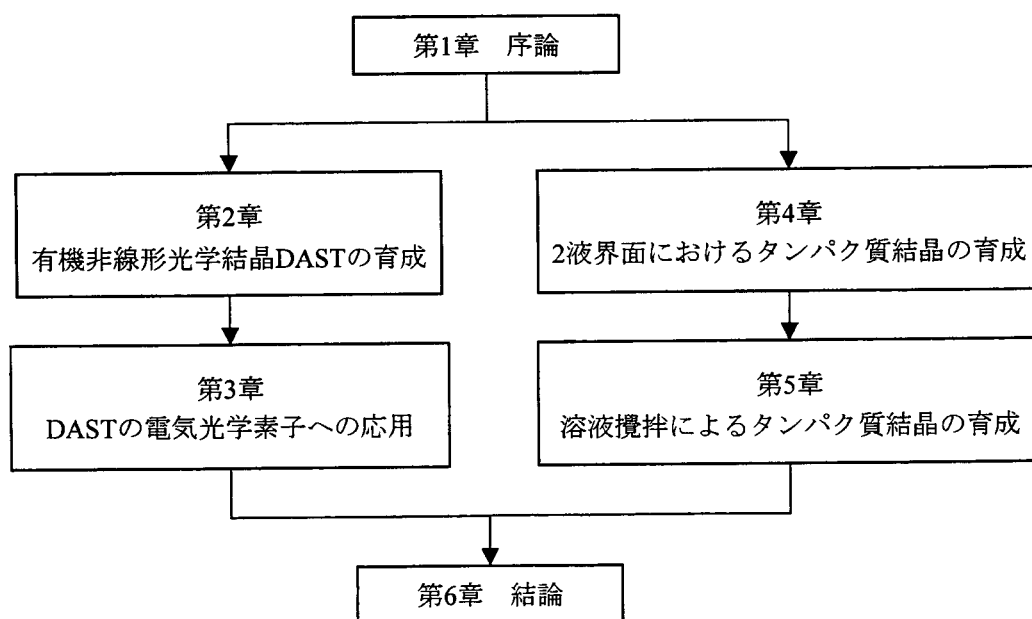


図 1.1 本論文の構成

第1章 序論

(Slope Nucleation 法)について述べる。また、それぞれの育成において、X 線回折ロッキングカーブ測定などによる DAST 結晶の品質評価について言及する。

第3章では、DAST の電気光学素子への応用として電界センサーに着目し、電気光学プロービングによる電気光学特性評価について述べる。現在使用されている電気光学材料の中で優れた性能を有する無機非線形光学結晶 KTiOPO_4 (KTP) [49,50]と比較することにより、DAST の電気光学特性を明らかにし、次世代電界センサーへの可能性について検討する。

第4章では、比重差と不溶性を利用したタンパク質結晶の新しい育成法(Two-Liquid System)を提案し、その有効性を明示する。Two-Liquid System と有機非線形光学結晶 DAST の育成技術に基づく温度降下法により、高品質および大型タンパク質結晶の育成について検討した結果を述べる。また、Two-Liquid System はタンパク質結晶の育成において最も一般的な蒸気拡散法への応用が可能であることを示し、従来法と比較することにより、その優れた特長を明らかにする。

第5章では、無機結晶などの大型高品質結晶の育成に用いられている溶液攪拌をタンパク質結晶の育成に応用するため、新しい溶液攪拌法(FAST)を提案する。従来のタンパク質結晶の育成では、溶液攪拌は有害無益とされてきたが、溶液攪拌の効果と必要性を明らかにする。また、機械的な刺激の少ない緩やかな溶液攪拌が重要であることを明確にする。そして、FAST により適度な溶液攪拌を実現することで、大型タンパク質結晶を高速育成できることを実証する。

第6章では、本研究で得られた成果を総括し、今後の課題と将来の展望について述べ、本論文の結論とする。

参考文献

- [1] 宮澤信太郎著: 光学結晶, 培風館 (1995)
- [2] V.G. Dmitriev, G.G. Gurzadyan and D.N. Nikogosyan: Handbook of Nonlinear Optical Crystals 3rd Revised Edition, Springer Series in Optical Sciences Vol.64, Springer-Verlag, Berlin (1999)
- [3] 福見俊夫監修: 新編 光学材料ハンドブック, リアライズ社 (2000)
- [4] I.V. Markov: Crystal Growth for Beginners: Fundamentals of Nucleation, Crystal Growth and Epitaxy, World Scientific, Singapore (1994)
- [5] 干川圭吾編著: バルク結晶成長技術, 培風館 (1994)
- [6] 日本結晶成長学会「結晶成長バンドブック」編集委員会編: 結晶成長ハンドブック, 共立出版 (1995)
- [7] J.P. Hermann, D. Ricard and J. Ducuing: Appl. Phys. Lett. **23** (1973) 178.
- [8] 加藤政雄, 中西八郎監修: 有機非線形光学材料, シーエムシー (1985)
- [9] D.S. Chemla and J. Zyss: Nonlinear Optical Properties of Organic Molecules and Crystals, Academic Press, Orlando (1987)
- [10] 梅垣真祐: 有機非線形光学材料, 有機エレクトロニクス材料シリーズ2, ぶんしん出版 (1990)
- [11] 中西八郎, 小林孝嘉, 中村新男, 梅垣真祐: 新・有機非線形光学材料 I・II, シーエムシー (1991)

- [12] 清水剛夫, 吉野勝美監修: 分子機能材料と素子開発, エヌ・ティー・エス (1994)
- [13] Ch. Bosshard, K. Sutter, P. Pretre, J. Hulliger, M. Flörsheimer, P. Kaatz and P. Günter: *Organic Nonlinear Optical Materials*, Taylor and Francis, London (1995)
- [14] H.S. Nalwa and S. Miyata: *Nonlinear Optics of Organic Molecules and Polymers*, CRC Press, Florida (1997)
- [15] P. Günter: *Nonlinear Optical Effects and Materials*, Springer Series in Optical Sciences Vol.72, Springer-Verlag, Berlin (1999)
- [16] A.F. Garito and K.D. Singer: *Laser Focus* **80** (1982) 59.
- [17] A.F. Garito, C.C. Teng, K.Y. Wang and O.Z. Khamiri: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **106** (1984) 219.
- [18] P. Günter: *Electro-Optic and Photorefractive Materials: Proceedings of the International School on Material Science and Technology*, Springer-Verlag, Berlin (1987)
- [19] D. Xu, M. Jiang and Z. Tan: *Acta Chemica Sinica* **41** (1983) 570.
- [20] A. Yokotani, T. Sasaki, K. Yoshida and S. Nakai: *Appl. Phys. Lett.* **55** (1989) 2692.
- [21] 佐々木孝友, 中井貞雄: *日本結晶成長学会誌* **16** (1989) 34.
- [22] 佐々木孝友: *オプトロニクス* **3** (1990) 119.
- [23] 安達宏昭: 大阪大学工学部, 卒業論文 (1996)
- [24] D. Eimerl, S. Velsko, L. Davis, F. Wang, G. Loiacono and G. Kennedy: *IEEE J. QE*-**25** (1989) 179.
- [25] D.A. Roberts: *IEEE J. QE*-**28** (1992) 2057.
- [26] 平山令明著: *生命科学のための結晶解析入門*, 丸善 (1996)
- [27] 大場茂, 矢野重信編著: *X線構造解析*, 朝倉書店 (1999)
- [28] J. Drenth: *Principles of Protein X-ray Crystallography 2nd Edition*, Springer Verlag, New York (1999)
- [29] D.E. McRee: *Practical Protein Crystallography 2nd Edition*, Academic Press, California (1999)
- [30] A. McPherson: *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1999)
- [31] T. Bergfors: *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips*, International University Line, California (1999)
- [32] T.M. Bergfors: *Protein Crystallization*, International University Line, California (1999)
- [33] N.E. Chayen: *Trends Biotech.* **20** (2002) 98.
- [34] H. Nakanishi, H. Matsuda, S. Okada and M. Kato: *Proc. MRS Int. Meet. Advanced Materials* **1** (1989) 97.
- [35] S.R. Marder, J.W. Perry and W.P. Schaefer: *Science* **245** (1989) 626.
- [36] S.D. Durbin and G. Feher: *J. Cryst. Growth* **76** (1986) 583.
- [37] M. Ataka and M. Asai: *J. Cryst. Growth* **90** (1988) 86.
- [38] T. Azuma, K. Tsukamoto and I. Sunagawa, *J. Cryst. Growth* **98** (1989) 371.
- [39] S.D. Durbin and G. Feher: *J. Mol. Biol.* **212** (1990) 763.
- [40] S.D. Durbin and W.E. Carlson: *J. Cryst. Growth* **122** (1992) 71.
- [41] P.G. Vekilov, M. Ataka and T. Katsura: *J. Cryst. Growth* **130** (1993) 317.
- [42] M. Ataka: *Prog. Cryst. Growth & Charact.* **30** (1995) 109.

第 1 章 序論

- [43] A. Nadarajah and M.L. Pusey: *Acta Cryst.* **D52** (1996) 983.
- [44] K. Kurihara, S. Miyashita, G. Sazaki, T. Nakada, Y. Suzuki and H. Komatsu: *J. Cryst. Growth* **166** (1996) 904.
- [45] F. Rosenberger, P.G. Vekilov, M. Muschol and B.R. Thomas: *J. Cryst. Growth* **168** (1996) 1.
- [46] R.F.P. Grimbergen, E.S. Boek, H. Meekes and P. Bennema: *J. Cryst. Growth* **207** (1999) 112.
- [47] L. Rong, T. Yamane and N. Niimura: *J. Cryst. Growth* **217** (2000) 161.
- [48] 佐崎元, 佐藤孝雄, 松浦良樹, 中嶋一雄: *まてりあ* **41** (2002) 481.
- [49] F.C. Zumsteg, J.D. Bierlein and T.E. Gier: *J. Appl. Phys.* **47** (1976) 4980.
- [50] J.D. Bierlein and C.B. Arweiler: *Appl. Phys. Lett.* **49** (1986) 917.

第 2 章

有機非線形光学結晶 DAST の育成

2.1 はじめに

有機材料は、分子設計が自由に行え、使用目的に適した分子を合成することが可能であるため、これまでに数多くの材料探索研究が行われてきた。有機非線形光学材料においては、大きな非線形性を持つ分子・構造設計が行われ、優れた非線形性を有する材料が開発されてきた。しかしながら、結晶育成が難しく、実用的な大きさの単結晶が得られにくい。また、弱いファンデアワールス力で結合した材料は、結晶硬度が低く、加工性に課題が残っている[1]。デバイス化のためには材料が容易に加工でき、加工後もその光学的、機械的特性が安定であることが必須である。有機結晶のうち、有機イオン性結晶はイオン結合に起因する比較的高い硬度を有し、結晶育成も比較的容易である[2-4]。本研究では、有機イオン性結晶の中で、特に優れた非線形性を有するといわれる 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST) [5,6]に着目し、その電気光学素子応用を目標とした。本章では、まず DAST の物理・化学的性質、結晶構造などを説明し、その合成法と結晶育成法について述べる。

2.2 DAST の材料特性と結晶構造

DAST は繊維高分子研究所の中西八郎教授(現 東北大学多元物質科学研究所)らにより 1989 年報告された有機イオン性非線形光学材料である[5,6]。DAST は単斜晶(点群: m , 空間群: Cc)に属し、光学的に 2 軸であり、大きな 2 次の非線形分子分極率を持つカチオンとその非線形性を最大限に利用しうる結晶構造を作り出すカウンターイオン(アニオン)によって結合している(図 2.1)。また、融点が 256°C と有機材料の中では比較的高く、熱的に安定である[7]。DAST は図 2.2 に示すような a - b 平面が最も大きい平板結晶が得られやすい。また、4 軸 X 線解析で分かった結晶内での 3 次元分子配列と、各結晶軸に投影した結晶内での分子のパッキングの様子を図 2.3 に示す[8]。DAST 分子は c 軸方向に層構造となっており、またカチオン分子が交互にクロスした形(それぞ

第2章 有機非線形光学結晶 DAST の育成

れ a 軸から 20° 傾いている) になっていることが分かる。表 2.1 に諸物性値をまとめた[9]。

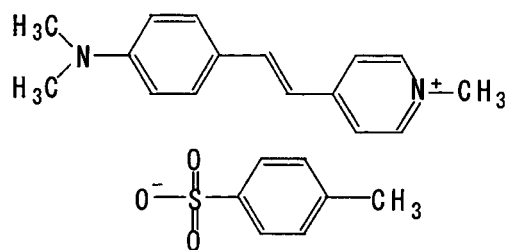


図 2.1 DAST の分子構造

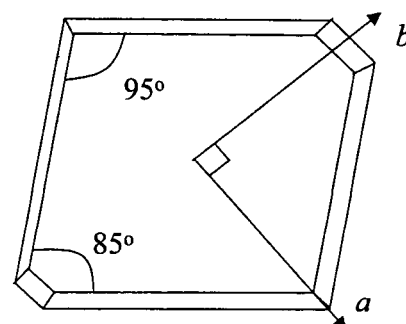
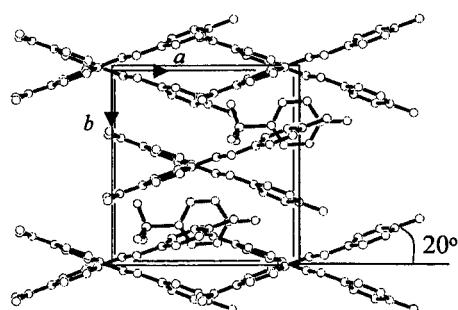
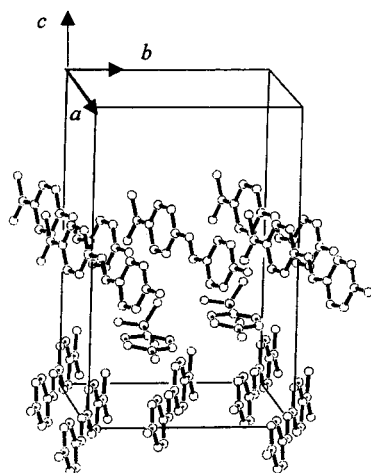
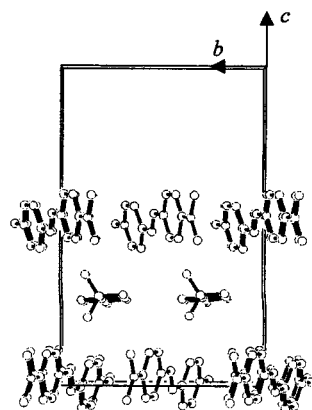


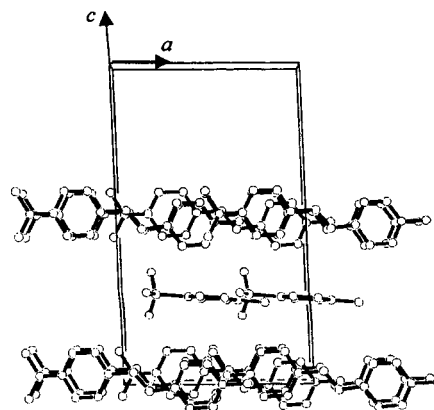
図 2.2 DAST の結晶形状と結晶軸



c軸方向の射影



a軸方向の射影



b軸方向の射影

図 2.3 DAST 結晶内の分子配列

表 2.1 DAST の諸物性値[9]

分子式	$C_{23}H_{26}N_2SO_3$	格子定数			
分子量	410.54	a [Å]	10.365	α [deg.]	90
結晶系	monoclinic	b [Å]	11.322	β [deg.]	92.24
空間群	Cc, No. 9	c [Å]	17.893	γ [deg.]	90
密度[g/cm ³]	1.300 (calc.)	V [Å ³]	2098.2	Z	4

2.3 DAST の合成

DAST は図 2.4 に示すように、2 段階の反応過程により得ることができる。特殊な合成法や特別な器具等を必要とせず、簡単に材料合成できるところも DAST の特長である。次の【1】から【4】の手順により、DAST を合成した。

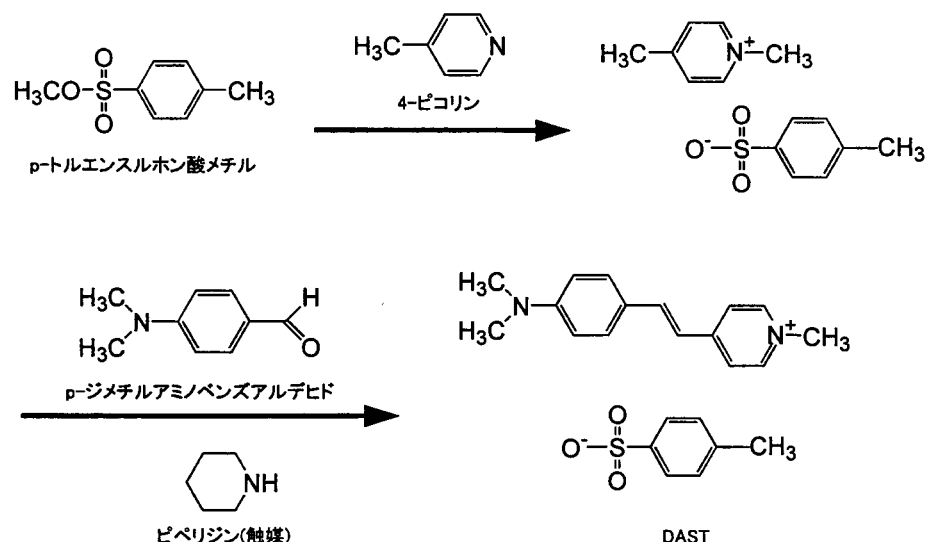


図 2.4 DAST の合成法

- 【1】p-トルエンスルホン酸メチルと 4-ピコリンをエチレングリコールジメチルエーテルに等モルずつ溶かし、攪拌した。
- 【2】白色の中間生成物 (4-methyl-N-methyl pyridinium tosylate) をろ過することにより回収し、十分に乾燥させた。
- 【3】中間生成物と p-ジメチルアミノベンズアルデヒドをメタノールに等モルずつ溶かし、触媒としてピペリジンを 5%モル加え、攪拌した。
- 【4】暗赤色の DAST をろ過することにより回収し、十分に乾燥させた。

合成を大気中で行うと、DAST が空気中の水と反応し、オレンジ色に変色し、非線形性が失われる。これは $\text{DAST} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (三斜晶, 点群: $\bar{1}$, 空間群: $P\bar{1}$) へと変化したためである[10]。そのため、窒素雰囲気中のグローブボックス内で合成を行ったり、吸水した $\text{DAST} \cdot \text{H}_2\text{O}$ を 100°C 、2 時間以上のアニールにより水を除去する方法で対処してきた[8]。しかしながら、DAST の純度については課題が残っていた。

高品質結晶を育成するには、原料中の不純物をできるだけ除去する、つまり高純度材料を使用する場合が多い[11]。DAST においても、原料の高純度化が必要と考え、第一化学薬品株式会社の協力を得て、エタノールによる再結晶法にて精製した。高速液体クロマトグラフ測定により、DAST の純度を調べたところ、未精製 DAST は純度 97%未満であったのに対し、精製後の DAST は純度 99.9%であった。窒素雰囲気中で合成した未精製 DAST とエタノールによる再結晶法にて精製した DAST の粉末 X 線回折プロファイルを図 2.5 に示す。ピークの相対強度は変化した、ピーク

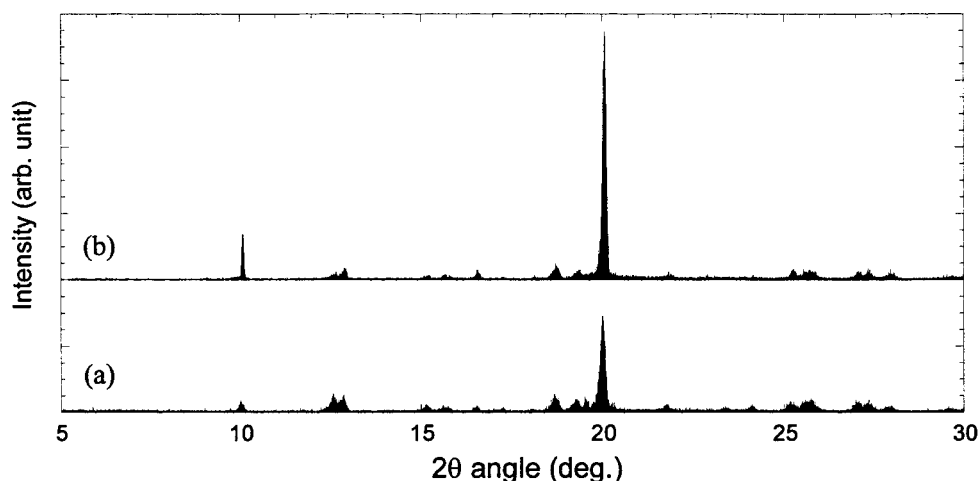


図 2.5 DAST の粉末 X 線回折プロファイル
(a) 未精製 DAST, (b) 精製した DAST

位置は同じであり、いずれも DAST 固有の回折データ[12]であると考えられる。再結晶法により精製した DAST は、結晶を粉末化したものであり、最も大きな結晶面である c 面、つまり $(0\ 0\ n)$ 面からの回折ピーク強度 ($2\theta \approx 10, 20^\circ$) が未精製 DAST と比べて増加したと考えられる。本研究では、この高純度原料を用いることで、高品質 DAST 結晶の育成を試みた（ただし、2.4 節の種結晶による育成では、未精製 DAST を使用した）。

2.4 種結晶による DAST 結晶の育成と評価

有機材料の結晶化の方法として、①融液からの成長、②溶液からの成長、③気相状態での成長などが挙げられる。DAST 結晶の育成では、分解や重合の問題から融液からの成長には適していない[13]。従って、熱による不安定性が少ない溶液からの成長が適している。この方法は、溶媒中に溶けた溶質（DAST）に対し、溶媒蒸発、温度降下などにより、過飽和度を持たせることにより結晶を成長させる。溶媒蒸発法による DAST 結晶の育成を行った報告[5,7,9,14,15]があるが、過飽和度を厳密に制御するのが難しく、結晶成長速度を一定に保つのが困難であり、結晶品質に問題があったと考えられる。本研究では、精密な過飽和度の制御が可能である温度降下法を選択した。本節では種結晶を用いた結晶育成について述べる。種結晶による結晶育成は、低過飽和度の溶液中において育成できるため、結晶の成長速度が制御しやすい。また、溶液内で成長する結晶は種結晶のみであるため、2 次核（雑晶）の発生がない限りは長期間の育成が可能であり、大型結晶の育成に適している。そのため、半導体材料であるシリコン結晶やレーザー産業で使用する酸化物結晶など、産業で必要とされる結晶の大半は、この方法により作製されている。実用化に適する品質を有した DAST 結晶の育成報告例はなく、種結晶による DAST 結晶の育成において、結晶成長速度と結晶品質の関係を調べ、高品質 DAST 結晶の育成条件を明らかにする。

溶液からの成長では、まず、結晶育成に適した溶媒を選択しなければならない。汎用溶媒に対する DAST の溶解度を表 2.2 に示す[16]。DAST はメタノールに対して最もよく溶け、得られる結晶形状も立体的であったため、溶媒としてメタノールを選択した。温度降下法では、溶液温度を制御することで、溶液の過飽和度を変化させる。結晶育成では、溶液の過飽和度を一定にする必要があるため、過飽和度の目安となる溶液温度に対する溶解度を測定した。DAST のメタノールに対する溶解度曲線を図 2.6 に示す。近似式は、溶解度 S (g/l)、溶液温度 t (°C) とすると

$$S = 5.50 \cdot e^{0.0445t} \quad (\text{式 2.1})$$

で表される(相関係数 $R^2=0.997$)。種結晶による DAST 結晶の育成は、この溶解度曲線に基づき、結晶育成を行った。

表 2.2 汎用溶媒に対する DAST の溶解度[16]

Solvent	Solubility (g/dm ³ , at 24°C)	Solvent	Solubility (g/dm ³ , at 24°C)
Methanol	15.20	Acetic acid	0.11
Formic acid	14.08	2-Butanon	9.54×10^{-2}
Ethanol	4.79	Cyclohexanone	8.66×10^{-2}
1-Propanol	1.79	Dichlorometane	7.07×10^{-2}
2-Propanol	1.52	Acetone	3.75×10^{-2}
Dimethylsulfoxide	0.80	1,4-Dioxane	4.28×10^{-3}
Dimethylformamide	0.52	Chlorobenzene	2.87×10^{-3}
Deionized water	0.23	Tetrahydrofuran	1.96×10^{-4}
Chloroform	0.15	Toluene	0.00

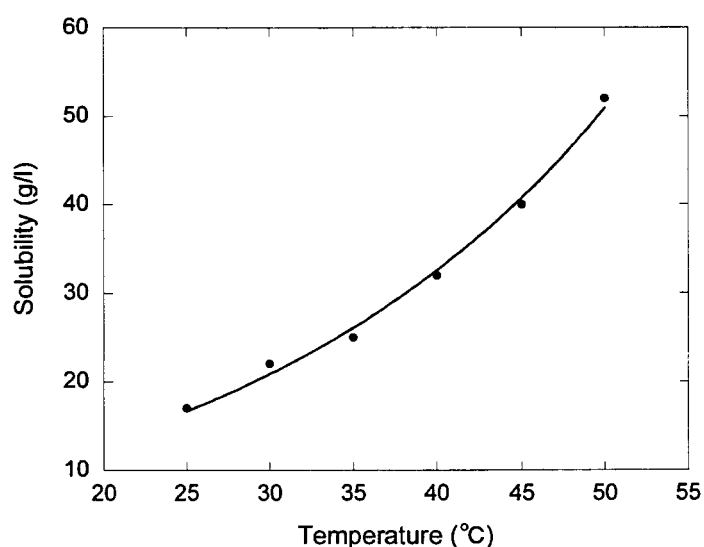


図 2.6 DAST のメタノールに対する溶解度曲線

第2章 有機非線形光学結晶 DAST の育成

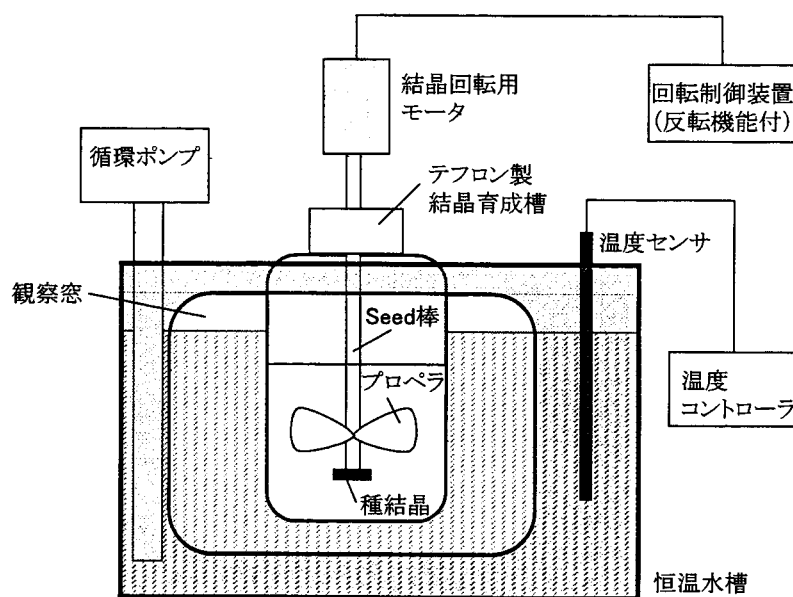


図 2.7 種結晶による DAST 結晶の育成装置図

育成装置は、 0.01°C の制御が可能な CHINO 製 KP 温度コントローラを使用することで、恒温水槽の温度を $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$ の精度で制御した。恒温水槽の温度制御範囲は、室温 $+5^{\circ}\text{C}$ から 80°C までだが、溶媒のメタノールが引火性であり、沸点が 64.7°C のため、安全性を考慮して、溶液を 55°C 以上に加熱することは避けた。また、溶液攪拌は結晶とプロペラを回転 (20 rpm) させることで行い、回転方向の後部でよどみを発生させない（溶液を均一化させる）よう、数分毎に回転方向を反転させた。これにより、溶液内の温度分布のばらつきを 0.03°C 以下に抑えた。

ガラス製の円筒型容器で育成を行ったところ、育成槽内部の溶液上部で、DAST の微結晶が大量に析出する現象が見られ、結晶成長速度を一定に制御するのが困難であった[8]。そこで、育成容器の材質を表面が滑らかなテフロン(PFA)にしたところ、析出が見られなかった。この結果をもとに、育成槽の全面改良をおこない、全てテフロン製の育成槽を作製した(図 2.7)。

育成溶液（飽和点約 40°C ）は 55°C で数時間保持し、攪拌することで DAST を溶解させた。その後、不純物を取り除くため、フィルタ（保留粒子径 $3\text{ }\mu\text{m}$ ）でろ過を行った。一方、種結晶は自然核成長で得られた良好なもの（ $1\sim 2\text{ mm}$ 角、厚さ 0.3 mm 程度の平板結晶）を選び、種結晶に余計な応力が加わらないようシリコンボン드로、DAST (001)面をプロペラ付きテフロン製 Seed 棒に接着した。種結晶の導入は、急な温度変化で種結晶が割れることを防止するため、溶液上部において種結晶を保持することにより溶液温度付近まで加熱し、かつ、種結晶や Seed 棒の導入による溶液の冷却で、自然核発生しないように、溶液温度を飽和点より数 $^{\circ}\text{C}$ 高くした。種結晶導入後、飽和点より温度を降下させる（過飽和状態にする）ことで、種結晶を成長させた。育成期間中は、恒温水槽の観察窓から結晶の成長をビデオカメラで測定することで、成長速度が一定となるように温度降下速度を調整した。結晶の取り出しは種結晶の導入と逆の手順であり、溶液中から結晶を引き上げ、溶液上部で結晶を十分に冷却させた後、育成槽から取り出した。

テフロン製育成容器を用いることで、結晶成長を温度降下速度のみで精密に制御できるようになったため、0.14 mm/day から 1.2 mm/day まで種々の成長速度で育成を行った。高速で育成した結晶(1.2 mm/day)は、ひび割れ（クラック）が生じていたのに対し、図 2.8 に示す低速で育成した結晶(0.14 mm/day)は、クラックもなく、結晶表面が滑らかで、外見上は良好な結晶であった。

結晶の光学的均一性を調べるため、偏光顕微鏡による観察を行った。成長速度 1.2 mm/day の結晶では、消光の度合いにばらつきが見られ、光学的に不均一であったが、成長速度が 0.4 mm/day 以下になると結晶全体で一様に消光した(図 2.9)。成長速度により消光の度合いが異なり、成長速度が遅くなるほど消光度が高く、結晶の光学的均一性が優れていた。

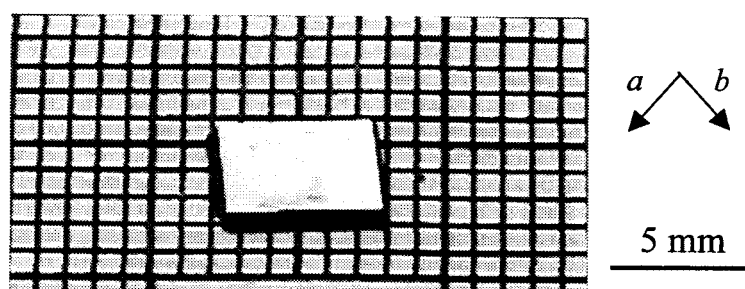


図 2.8 種結晶から育成した DAST 結晶
(サイズ: $5.8 \times 3.4 \times 1.0 \text{ mm}^3$, 成長速度: 0.14 mm/day, 育成期間: 11 日)

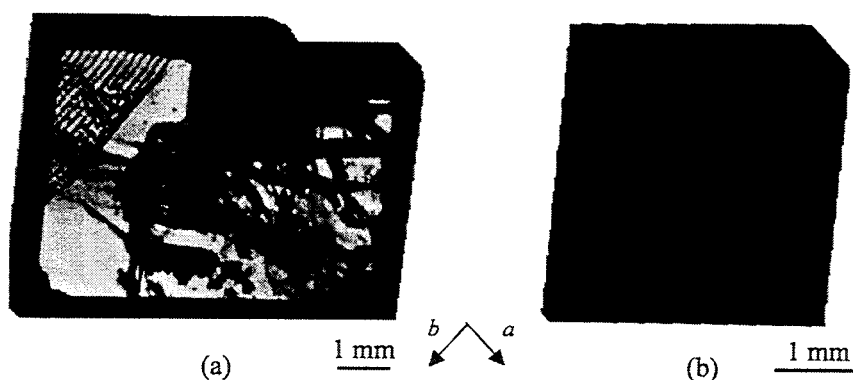


図 2.9 DAST 結晶の偏光顕微鏡写真（消光位）
(a) 成長速度: 1.2 mm/day, サイズ: $7.5 \times 5.3 \times 1.8 \text{ mm}^3$
(b) 成長速度: 0.4 mm/day, サイズ: $3.3 \times 3.2 \times 1.0 \text{ mm}^3$

次に、DAST (001)面の X 線回折ロッキングカーブ測定による結晶品質評価（分子配向性の評価：モザイク度の評価）を行った。高度な完全性をもつサンプルを高い精度で測定するためには、単色性や平行性の高い X 線が必要である。完全結晶に近い単結晶が得られているシリコンやゲルマニウム結晶からは、非常に単色性や平行性に優れた回折 X 線が得られるため、これらを単色化結晶として使用すると精度の高い測定が可能となる。本研究では、ゲルマニウム結晶を用いた 4 結晶モノクロメータ X 線回折装置（理学電機製 SLX-2000）を使用した。ロッキングカーブは、試

第2章 有機非線形光学結晶 DAST の育成

料をブラッグ角近傍で回転させながら、その回折強度の回折方向角度分布を出力したものであり、試料結晶が完全に近いほど、ロッキングカーブはブラッグ角近傍でよりシャープに現れる。つまり、ロッキングカーブの広がり（半値幅, FWHM: Full-Width at Half-Maximum）は、試料結晶の不完全性、つまり分子配向性（モザイシティ）に応じて変化するため、結晶性を評価できる。本装置の入射 X 線の角度広がり、半値幅 5.2 秒であった。

測定に用いたサンプルは、いずれも偏光顕微鏡で結晶全体が一様に消光した結晶で、その測定では品質の違いが明らかにできなかったが、X 線回折ロッキングカーブ測定においては、結晶性の違いが明確に現れた(図 2.10)。この結果から、成長速度が遅くなるにつれて X 線回折ピークがより鋭くなり、結晶品質が向上していることが分かった。結晶の成長速度が速いと結晶化する際に、分子が規則正しく配列しにくく、分子配向性（結晶品質）が悪くなったと考えられる。つまり、DAST の結晶品質が成長速度に強く関連していることが明らかとなった。図 2.10 に示した成長速度 0.14 mm/day の DAST (001)面の X 線回折ロッキングカーブ半値幅は、37.4 秒(1 秒は $1/3600^\circ$, 本論文では角度秒を秒と省略する)であった。この値は、他の研究機関から報告された DAST の半値幅 194 秒[17]の 1/5 以下であり、非常に高品質な結晶であった。この測定系において、他の結晶の X 線回折ロッキングカーブ測定を行ったところ、市販の無機高品質シリコン(Si)結晶 (111)面の半値幅は 10.4 秒であった。また、同じ有機イオン性結晶 L-Arginine Phosphate Monohydrate (LAP) [18]の (100)面の半値幅においても 11.9 秒と非常に小さかった。これらの値に比べると明らかに DAST の半値幅はまだ大きく、実用化には更なる高品質化が必要であると考えられる。

種結晶による育成において、自然核発生した結晶は雑晶と呼ばれ、本来、好ましくない析出である。雑晶は過飽和度が過ぎる場合などに発生し、たいていは雑晶同士が互いに引っ付いてしまう。しかしながら、稀に単結晶として存在しているものがあり、育成後に慎重に取り出してみると、なかには良質な結晶があった。自然核成長により得られた DAST 結晶の X 線回折ロッキング

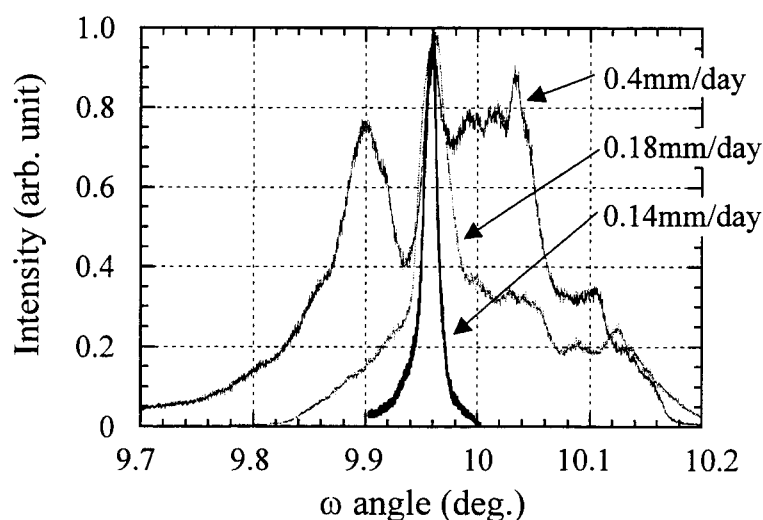


図 2.10 DAST (001)面のロッキングカーブ測定結果

表 2.3 X 線ロッキングカーブ半値幅の比較

結晶	FWHM (arcsec)
Si (111)	10.4
LAP (100)	11.9
DAST (001) <自然核成長>	15.8
DAST (001) <種結晶育成>	37.4

カーブ測定を行ったところ、半値幅 15.8 秒を示す、優れた結晶性を有するものがあった。この結晶は、立った状態、つまり、DAST (001)面が非接触な状態で成長したものであり、次節で述べる斜面を用いた結晶育成法(Slope Nucleation 法)が開発されるきっかけとなった。ロッキングカーブ測定の結果を表 2.3 にまとめた。

最後に、DAST の機械的強度を調べるため、ビッカース硬度を測定した。マイクロビッカース硬度計 (松沢精機製 DMH-2) を用いて、DAST (001)面の硬度測定を行った(荷重 10g、荷重時間 20 秒)。サンプルによりビッカース硬度の値にばらつきが見られ、X 線回折ロッキングカーブ半値幅(FWHM)に対するビッカース硬度をまとめたところ、図 2.11 に示すような相関関係があることが分かった。FWHM の値が減少する(結晶成長速度が遅くなる)につれて、ビッカース硬度の値が増加し、最大値は 49 であった。この結果は、結晶品質と硬度には密接な関係があることを示している。一般的に、結晶の欠陥が増加すると硬度が上昇すると言われており、例えば、金属などでは機械的強度を向上させるために、意図的に不純物添加を行っている(図 2.12)。これは結晶性がかなり低い領域において有効な手法であり、その効果は金属、共有結合結晶、イオン性結晶などの結晶構造単位の違いに強く依存する。一方、高品質な結晶では、理想的な単結晶構造に近づく程、つまり、欠陥数の減少により機械的硬度は向上すると報告されており[19,20]、DAST 結晶においても類似の傾向が得られていると考える。

非線形光学結晶のビッカース硬度[2]を表 2.4 にまとめた。DAST のビッカース硬度は無機結晶の KTiOPO_4 (KTP)や KH_2PO_4 (KDP)に比べると小さいが、同じ有機イオン性結晶である LAP, Tris Hydroxymethyl Amino-Methane Phosphate (THAMP), Tris Hydroxymethyl Amino-Methane Sulphate (THAMS)と同程度であり、イオン結合に起因した比較的硬い結晶であることを示している。超精密ダイヤモンド旋盤により LAP 結晶の光学面が得られている[2]ため、同程度の硬度を有する DAST 結晶の加工も十分可能であると考ええる。また、中部大学難波らは、超精密平面研削盤[21]

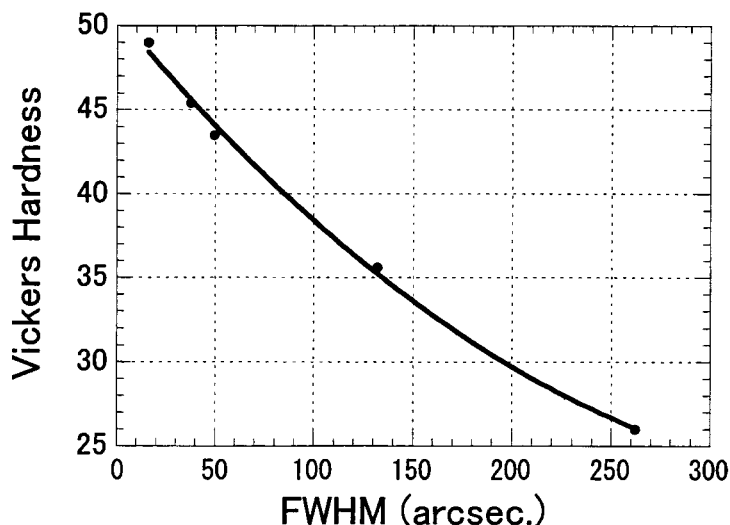


図 2.11 DAST (001)面のビッカース硬度

第2章 有機非線形光学結晶 DAST の育成

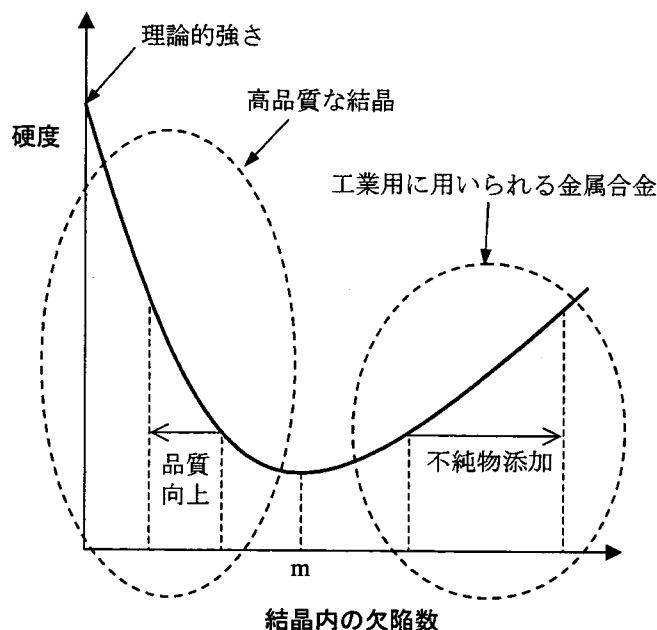


図 2.12 結晶内の欠陥数と硬度

表 2.4 非線形光学結晶のビッカース硬度

	材料	分子間の結合	ビッカース硬度
無機結晶	KTP (KTiOPO_4)	ion	566
	KDP (KH_2PO_4)	ion	135
有機結晶	LAP	ion	56
	THAMP	ion	58
	THAMS	ion	54
	DAST	ion	49
	Thienylchalcone	van der Waals	12
	Urea	hydrogen	9

を用いることで、van der Waals 結合している有機非線形光学結晶チェニルカルコン[22] (ビッカース硬度：12)などの研削に成功しており、ビッカース硬度が 10～30 程度の軟らかい有機非線形光学結晶においても、比較的光学面に近い滑らかな面が得られたことを報告している[23-25]。最近、超精密ダイヤモンド切削(豊田工機製超精密非球面加工装置)により DAST 結晶の加工が行われ、光学面として使用できる滑らかな面の作製に成功している[26,27]。また、原子間力顕微鏡(AFM: Atomic Force Microscope)の探針への加重を制御すること(AFM 研磨法)により、分子スケールで平坦な表面が得られたとの報告もある[28,29]。

以上の結果から、DAST の結晶品質が成長速度に強く相関していることが明らかである。また、機械的特性である硬度に関しても、密接な関係があることが分かった。つまり、結晶成長速度が遅くなるにつれて、結晶品質と硬度が向上した。本実験では、最も低速で育成した DAST 結晶(0.14

mm/day)の品質が最良であった。この結晶の成長速度は、一般的な無機結晶などの成長速度と比べ、極めて低速である。例えば、無機非線形光学結晶 KDP は、20～50 mm/day 程度の超高速育成が報告されている[30-34]。また、一般的には水溶性結晶の成長速度は 1 mm/day が目安とされ[35]、有機イオン性結晶 LAP においては、最大 1.5 mm/day の成長速度が得られている[36]。良質な DAST 結晶が得られたときの成長速度 0.14 mm/day は、この値に比べて、10 倍程度も小さい。しかしながら、本実験の結果を鑑みると、DAST などの分子構造が複雑な有機材料において、高品質結晶を育成する（分子を 3 次元的に規則正しく配列する）には、非常に低速な結晶成長が必要であると考えられる。

2.5 Slope Nucleation 法による DAST 結晶の育成と評価

自然核成長による結晶育成は、数ミリ角程度の小型結晶が得られやすいため、種結晶を作製する時などに、よく用いられる。また、①一度の育成で多数の結晶が得られる、②育成装置が単純、③育成手順が容易などの特長がある。反面、結晶の析出位置や個数などの不確定な要素が多く、結晶成長の制御が難しいといった問題点がある。DAST 結晶の自然核成長による育成においては、次の 2 つが大きな問題として挙げられる。DAST は(001)面を最も大きな面とする平板結晶になりやすいことから、育成容器の底に(001)面が接触して成長する 경우가多く、容器接触面では表面形状が歪になったり(図 2.13)、X 線回折ロッキングカーブ半値幅が大きくなったりと、結晶品質の低下が見られた。また、結晶の析出位置が不確定なことから、近接して発生した結晶同士が互いに引っ付き、多結晶化した(図 2.14)。しかしながら、前節で述べたように DAST (001)面が非接触な状態で成長した結晶は、優れた結晶品質を有していたことから、より好ましい状態で育成する新しい結晶育成法が 1999 年に本学で開発された。この方法は Slope Nucleation 法と呼ばれ、溝のついたテフロン板を DAST 溶液中に斜面として導入するものである[37,38]。原理は単純であるが、上記で述べた自然核成長における 2 つの問題点を解決した。本節では、この優れた結晶育成技術である Slope Nucleation 法を用いて、DAST の実用化に求められる高品質結晶の育成についての研

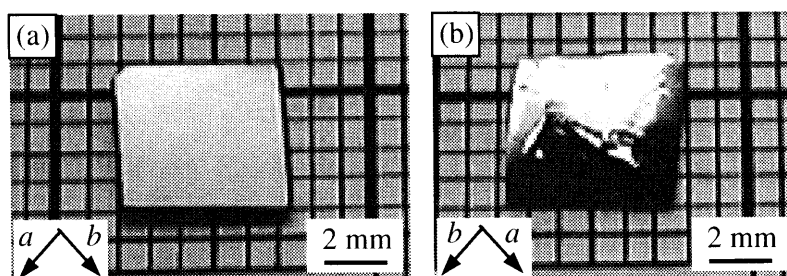


図 2.13 容器底面に接触して成長した DAST 結晶
(a) 上面(非接触面), (b) 下面(接触面)

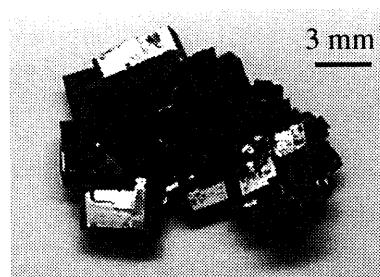


図 2.14 多結晶化した DAST

第2章 有機非線形光学結晶 DAST の育成

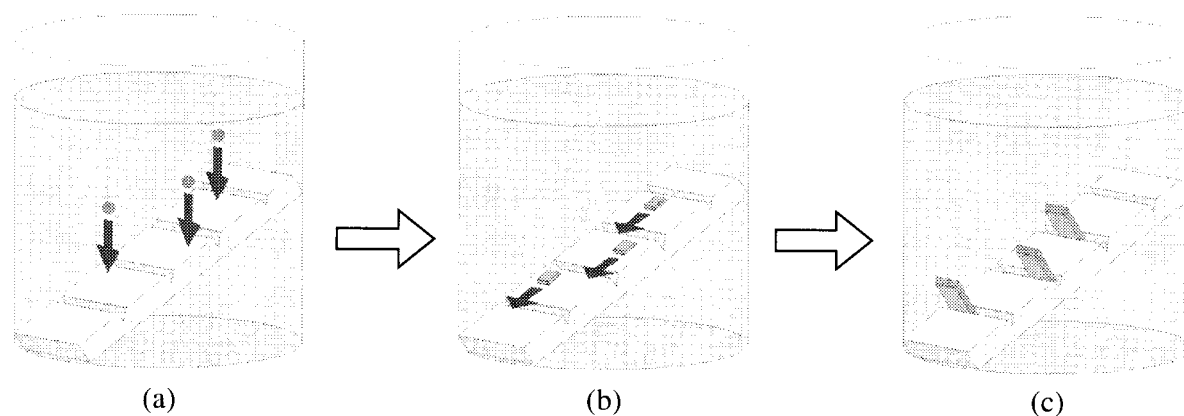


図 2.15 Slope Nucleation 法の模式図

- (a) 溶液中で結晶核が発生し斜面上に析出, (b) 結晶が斜面上を滑り落ちる,
(c) 溝部分で結晶が立ち、そのまま成長する

究成果をまとめる。前節で示したように、種結晶から育成した結晶よりも、自然核成長から得られた結晶の方が高品質であった。また、種付け・種入れなどの手間や大量生産、育成コストを考慮すると、自然核成長からの育成である Slope Nucleation 法が、DAST 結晶の実用化には適した方法であると考えられる。ただし、現状では数ミリ角の小型結晶しか作製できないという課題が残されているが、電界センサーなどに使用される結晶サイズは数ミリ角以下であり、産業ニーズは十分にある。

Slope Nucleation 法の育成手順を図 2.15 に示す。溶液温度を降下させていくと、溶液の過飽和度が高くなり、自然核が発生する。その核がテフロン斜面上に微結晶として析出し、滑らかなテフロン斜面上を滑り落ちる。DAST 結晶が溝部分に到達すると、滑り落ちてきた勢いにより溝部分で立ち、(001)面を縦にした状態で固定される。その後は、種結晶による結晶育成と同様に、温度降下を与えることで結晶を成長させる。本育成法では、結晶の成長位置を溝部分に特定できるため、多結晶化を抑制できる。また、DAST (001)面が非接触な状態で成長するため、(001)と $(00\bar{1})$ の両面が平滑となり、容器との接触による結晶歪みを最小限に止めることが可能である。その結果、X 線回折ロッキングカーブ半値幅が、従来の自然核で得られた DAST 結晶は 50～130 秒であったのに対し、Slope Nucleation 法で得られた DAST 結晶は 20～58 秒と品質の良い結晶を得ることに成功している(それぞれ 5 サンプル測定)[38]。しかしながら、前節で得られた半値幅 15.8 秒を示す DAST 結晶の育成再現には至っていない。また、電気光学評価において、結晶面内で測定場所を変化させると、電気光学感度のばらつきが生じた。これは、結晶品質に問題があると考えられる(詳細は第 3 章参照)。本研究では、下記に示す 4 つの改善を行い、DAST 結晶の更なる高品質化を試みた。

まず、①原材料となる DAST 粉末(微結晶)の高純度化を行った。一般的に、純度が高い物質ほど、良質な結晶が得られる。不純物が溶液中に存在すると結晶中に取り込まれ、分子配列の乱れ(欠陥)が生じ、結果として結晶品質の低下につながる。また、育成の再現性などの点でも有利である。

これまで使用してきた未精製 DAST は、純度 97% 未満であった。これは主に、未反応原料や触媒として使用したピペリジンが不純物として含まれていると考えられる。これまで、メタノールによる再結晶法にて純度 99.8% 以上の DAST を得たという報告がある[13]。そこで、エタノールによる再結晶法にて精製したところ、純度 99.9% の DAST 材料が得られた(2.3 節)。この高純度 DAST 材料を用いて、結晶育成を行うにあたり、再度、メタノールに対する溶解度曲線を作成した。得られた溶解度曲線を図 2.16 に示す。近似式は、溶解度 S (g/l)、溶液温度 t (°C) とすると

$$S = 4.96 \cdot e^{0.0448t} \quad (\text{式 2.2})$$

で表される($R^2=0.999$)。式 2.1 および式 2.2 は慣例的に使用される近似式の一つであるが、反応速

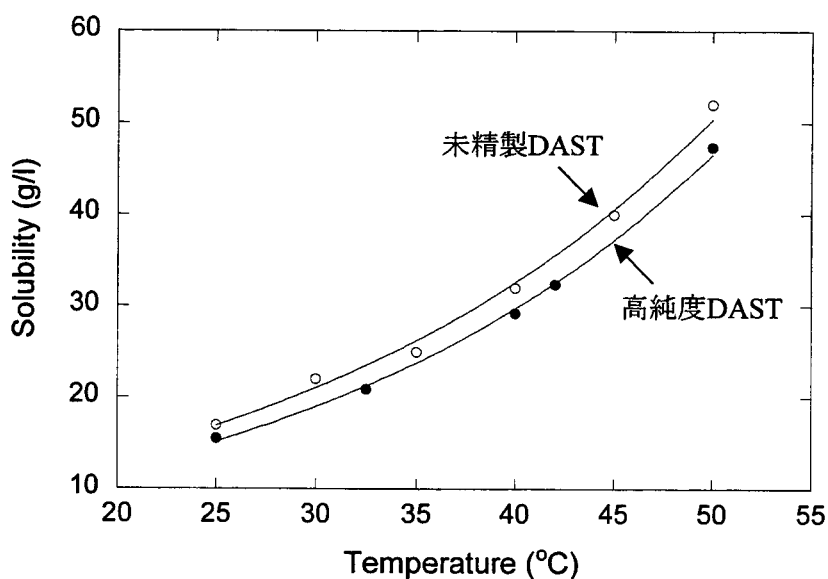


図 2.16 DAST のメタノールに対する溶解度曲線
●高純度 DAST, ○未精製 DAST

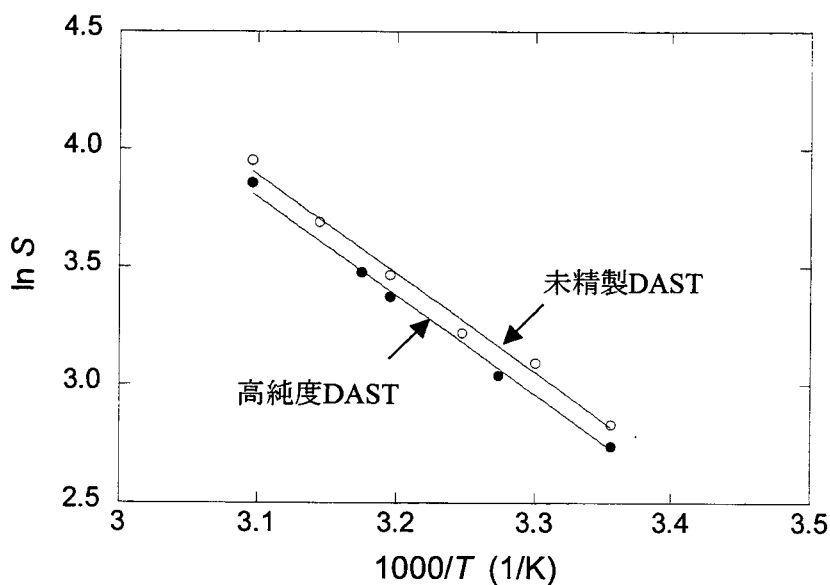


図 2.17 DAST の溶解度曲線 (アレニウスプロット)
●高純度 DAST, ○未精製 DAST

第2章 有機非線形光学結晶 DAST の育成

度の理論から考えると、溶解度 S はボルツマン型

$$S = A \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) \quad (\text{式 2.3})$$

で表される。ここで A は頻度因子、 E は活性化エネルギー(J/mol)、 R は気体定数(8.314 J/mol・K)、 T は絶対温度(K)である。式 2.3 において、両辺の対数を取り、アレニウスプロットを行った結果を図 2.17 に示す。 $\ln S$ と $1/T$ との関係は直線となり、未精製 DAST と高純度 DAST の傾き、つまり、活性化エネルギーは等しく、その値を計算したところ 34.8 kJ/mol であった。この結果から、溶解度の変化は DAST の純度に起因していると考えられる。また、高純度 DAST の溶解度は、従来の未精製 DAST の溶解度に比べ、約 9 % 小さくなっており、同量の DAST を溶かした場合、飽和点が数℃上昇することが分かった。以後の実験では、式 2.2 で表される溶解度曲線を基に、結晶育成を行った。

次に、②溶質の溶解時間について検討を行った。溶液状態の制御として、材料を一度完全に溶解させることは、結晶育成において重要であると考えられる。溶液中の溶質状態は分子集合体であるクラスターを形成している[39-49]。さらに、DAST はイオン性材料であるため、溶液内ではカチオン(陽イオン)とアニオン(陰イオン)に電離する。そのため、DAST 溶液は電気伝導性を持ち、DAST 分子クラスターの分解度が大きくなる程、電気伝導の担い手となるイオンの数が増加し、導電率が高くなると考えられる。その様子を図 2.18 に模式的に示した。つまり、DAST 溶液の導電率の変化を測定することにより、クラスター分解の様子を観察できる。そこで、加熱時間と導電率の関係を調べた。導電率は浸漬式導電率計(堀場製作所製 ES-14)を用いて測定した。

濃度 35 g/l に調整した DAST 溶液 100 ml ずつ、8 本のテフロン製容器に入れ、スターラーにより溶液を攪拌しながら、55℃の恒温水槽内で一定時間、加熱した。その後、スターラーによる攪拌を停止し、導電率セルを浸漬させて、導電率 D (S/cm)を測定した。それぞれの加熱時間は 2～240 時間とした。溶液の導電率は温度によって変化するため、一般に 25℃における値に換算する。ただし、本実験では、いずれも 55℃における DAST 溶液の導電率を測定しており、温度による影

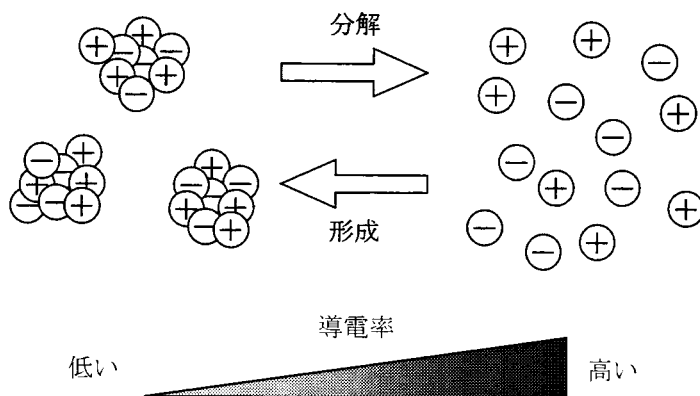


図 2.18 クラスターの分解・形成による導電率変化

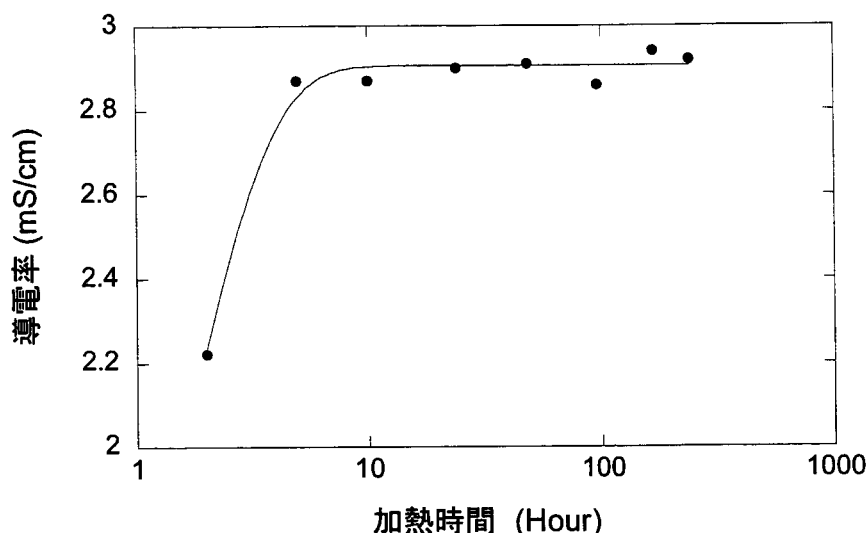


図 2.19 加熱時間と導電率

響は無視できる。そのため、実測値にて比較した。実験結果を図 2.19 に示す。加熱時間とともに導電率が指数関数的に高くなり、10 時間を越えるとほぼ一定値となった。導電率の変化が、クラスターの溶解過程を示すものであるとすると、Noyes-Whitney-Nernst の溶解式

$$C = C_s \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{k a t}{V}\right) \right\} \quad (\text{式 2.4})$$

(ただし、 C は溶液濃度、 C_s は溶解度、 k は溶解速度定数、 a は溶解有効面積、 V は溶媒量、 t は溶解開始後の時間) で表される物理現象と同じであると考えられる。そこで、導電率 D と加熱時間 t (hour) の指数関数近似を行ったところ、近似式

$$D = 2.91 \{ 1 - \exp(-0.73t) \} \quad (\text{式 2.5})$$

が得られ、実験結果とよく一致した($R^2=0.992$)。その近似曲線を図 2.19 に示した。この結果から、見かけ上、溶解している溶液でも、クラスターレベルになると十分に分解されておらず、この実験条件においては、その分解に少なくとも 10 時間程度の加熱が必要であることが分かった。従来の育成では、加熱時間を数時間としており、DAST 分子クラスターの分解が不十分であり、平衡状態に達していなかった可能性がある。そのため、加熱時間を 10 時間とした。クラスターを十分に分解した均一な溶液は、高品質 DAST 結晶を育成する上で必要であると考えられる。育成前の長時間加熱(溶液中の分子クラスターを分解すること)の必要性は、これまでも報告されている[31-34]。また、超音波印加による音響エネルギーが、クラスターの分解に有効であることも示されている[31,33,50]。

それから、③育成プログラムを最適化した。種結晶による育成において、結晶品質を向上させるには、極めて低速で結晶成長させる必要があることが分かった。一方、自然核成長による育成では、結晶を析出させるために、過飽和度を高くする必要があり、そのような高過飽和溶液中で

第2章 有機非線形光学結晶 DAST の育成

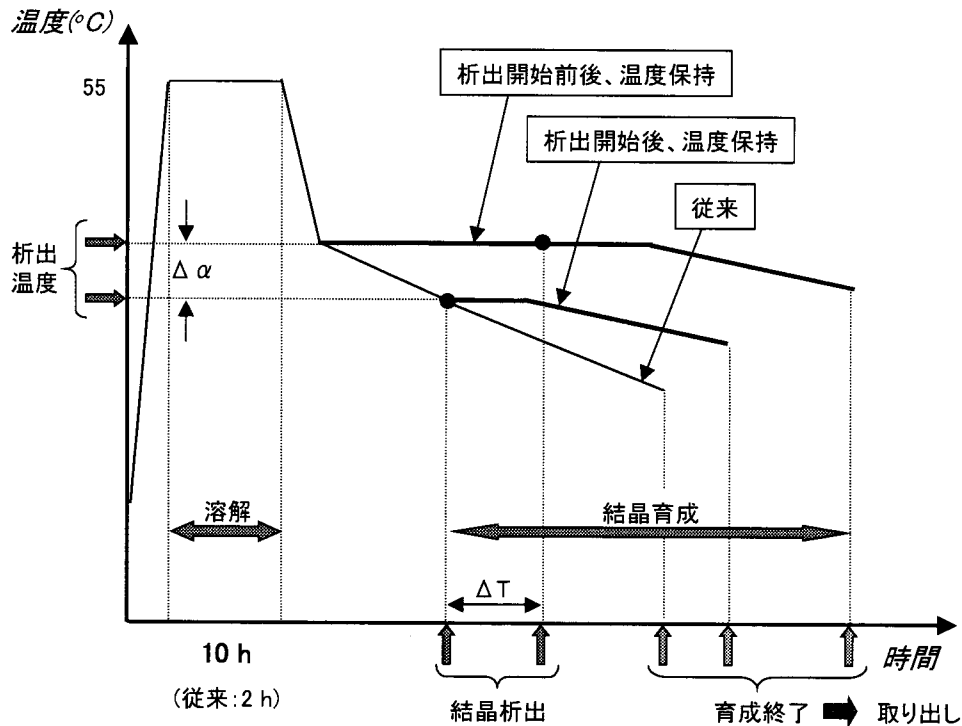


図 2.20 DAST 結晶の育成プログラムの比較

は、結晶が速く成長する。これは、低過飽和溶液内での育成が可能な種結晶による育成との大きな相違点の一つである。有機物などの分子量が大きい物質は、過飽和度を高くしないと結晶化しない。これは準安定領域が大きいこと、つまり臨界核半径が大きいことに起因する。高過飽和溶液では、ひとたび結晶化が始まると、結晶核の大量発生や析出開始直後の結晶が急成長してしまうため、結晶品質に問題が生じる場合が多い。

これまでの育成は、結晶が析出する前後において、一定速度の温度降下を与えている場合が多く、結晶析出の有無や成長状況に応じて、温度降下速度を変化させない育成プログラムであった。そのため、結晶析出開始後も過飽和度が低下することなく、結晶成長が速かったと考えられる。そこで、結晶析出開始直後に溶液温度の保持、好ましくは析出開始前後において溶液温度を保持することにより、析出開始直後における結晶の急成長を抑制した。また、その後の結晶育成においても、温度降下速度を一定とすることなく、結晶の成長を観察しながら、適度な温度降下を与えることで、可能な限り低速で結晶を成長させた。そのため、結晶が析出するまでの時間と育成時間は、従来に比べ、長くなった。本研究で実施した育成プログラムと従来の育成プログラムとの比較を図 2.20 にまとめた。

最後に、④取り出し方法の改善を行った。DAST 溶液は溶媒として揮発性の高いメタノールを用いている。そのため、育成終了後の結晶取り出しの際に、結晶表面に付着した DAST 溶液が蒸発し、急激に濃縮された溶液中で DAST 結晶の微結晶が生じ、最終的には育成した DAST 結晶表面に付着する。図 2.21 に偏光顕微鏡の消光位における写真を示すが、付着物は結晶方位がそれぞ

れ異なるため、消光していない。付着物は DAST であるため、化学的手法により取り除く場合には、育成した結晶への影響が考えられる。また、メタノールの気化による局所的な急冷が、結晶品質に悪影響を与える恐れもある。

本研究では、図 2.22 に示す比重差溶媒洗浄法と超音波洗浄により、結晶取り出し時の問題点を解決した。この方法では、DAST 溶液と同じ温度のフロリナート(商標名、液状高分子フッ化炭

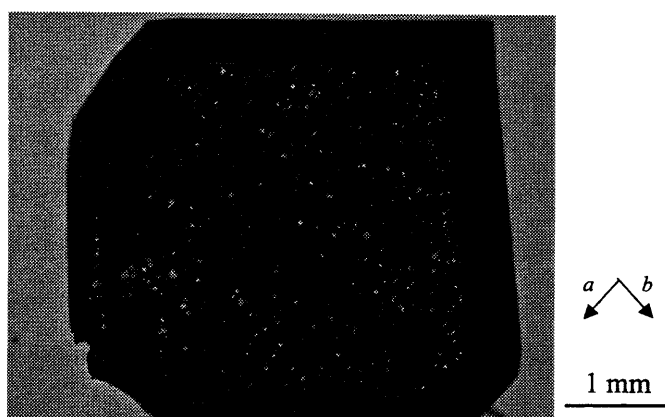


図 2.21 結晶表面に付着した DAST 微結晶

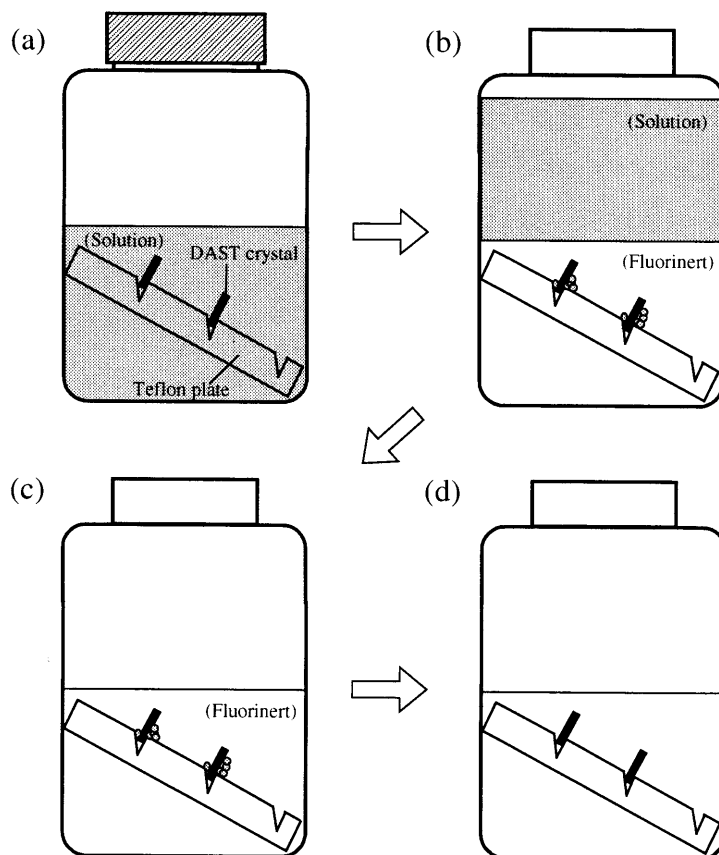


図 2.22 比重差溶媒洗浄法と超音波洗浄による DAST 結晶の取り出し
(a) 育成終了時, (b) フロリナートを追加, (c) DAST 溶液を取り除く, (d) 超音波洗浄後

第2章 有機非線形光学結晶 DAST の育成

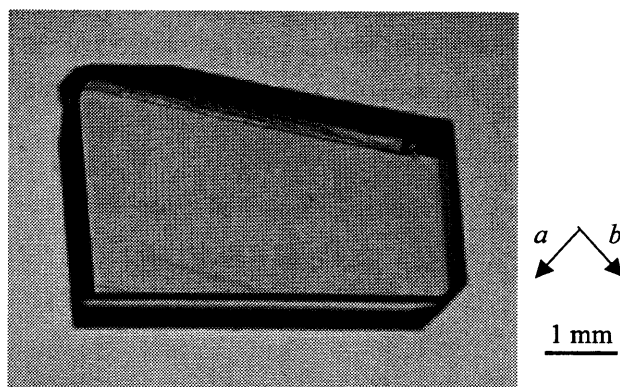


図 2.23 比重差溶媒洗浄法と超音波洗浄により取り出した DAST 結晶

素、3M 社(米国))を育成容器に注入する。フロリナートは無色透明の不活性液体で、密度が大きい (FC-77: 1780 kg/m^3) などの特徴を有する。フロリナートとメタノール(密度 791 kg/m^3)を混合すると、完全に分離するため、DAST 結晶が形成された斜面をフロリナートで完全に浸漬させた後、育成容器の上部にフロリナートと分離して存在する DAST 溶液(メタノール層)を除去した。このとき、斜面に固定されていない雑晶なども、フロリナート上に浮かぶため、除去できる。その後、超音波洗浄機を用いて、結晶表面に残存する DAST 溶液を完全に除去した。フロリナートを室温まで自然冷却した後、DAST 結晶が固定されているテフロン斜面をフロリナート層から引き上げ、表面付着物の極めて少ない DAST 結晶を得た(図 2.23)。

以上の①～④の改善を施した Slope Nucleation 法にて、DAST 濃度 35 g/l の溶液を用いて、結晶育成を行った。得られた DAST 結晶の X 線回折ロッギングカーブ測定を行い、その結晶性を評価したところ、DAST (001)面のロッギングカーブ半値幅は $13 \sim 33$ 秒であり、従来の Slope Nucleation 法で得られた DAST の半値幅 $20 \sim 58$ 秒よりも値が小さくなっており、結晶品質が向上していることが分かった(図 2.24)。また、これらは 5 つのサンプルにおける半値幅の値を示しているが、今回得られた DAST 結晶では、その幅が小さくなっていた。これは、結晶品質の個体差ばらつきが減少したことを示している。また、本研究で得られた DAST の最小ロッギングカーブ半値幅 13 秒は、無機高品質シリコン結晶 (111)面のロッギングカーブ半値幅 10.4 秒に迫る値であり、高品質 DAST

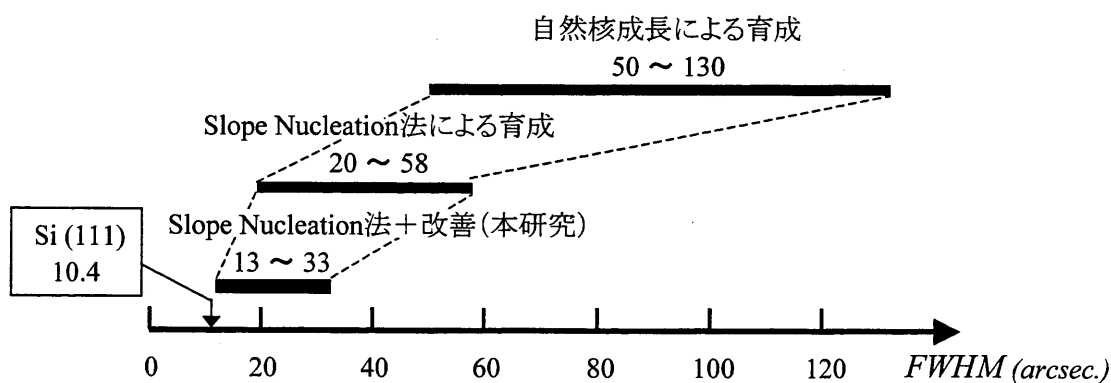


図 2.24 DAST(001)面の X 線ロッギングカーブ半値幅の比較

結晶が得られたことを示す好結果である。

本研究では、Slope Nucleation 法の育成において、4つの改善を行ったが、この中で高品質化に最も有効であった改善策は、育成プログラムの最適化であると考えられる。種結晶による DAST 結晶の育成において、結晶品質が成長速度に強く相関しており、極めて低速な結晶成長が必要であることが分かった。そのため、結晶析出開始前後の溶液温度保持などにより結晶の急成長を抑制し、可能な限り低速で成長させることで、高品質 DAST 結晶の育成を可能とした。さらに、種結晶が成長する程度の低過飽和溶液において、自然核発生させることができれば、極めて高品質な DAST 結晶の育成が可能となる。また、自然核成長による育成の特徴である析出温度、析出時期の不確定さの問題解決につながる。本論文では詳細を述べないが、高強度短パルスレーザーを低過飽和溶液に集光照射し、それを摂動として結晶核を生成し、単結晶を育成することを検討した。現在までに、ナノ秒 YAG レーザーおよびフェムト秒チタンサファイアレーザーを低過飽和溶液中に集光照射させることで、結晶析出が観測できた[51,52]。この試みは新しい現象の可能性があり、この現象解明は今後の挑戦すべき課題である[53]。今後、結晶核生成の条件を探索すると同時に、そのメカニズムについても検討を進めていく予定である。

2.6 まとめ

本章では、有機非線形光学結晶 DAST の物理・化学的性質と結晶構造を説明し、DAST の合成法を示した。また、温度降下法による高品質 DAST 結晶の育成について検討した結果を述べた。得られた知見を以下に要約する。

- DAST 結晶の育成溶媒としてメタノールを選択し、その溶解度曲線を作成した。溶解度 S (g/l)、溶液温度 t (°C) とすると、未精製 DAST (純度 97% 未満) においては $S = 5.50 \cdot e^{0.0445t}$ 、精製した高純度 DAST (純度 99.9%) においては $S = 4.96 \cdot e^{0.0448t}$ と近似できることが分かった。相関係数 R^2 はそれぞれ 0.997、0.999 であった。高純度 DAST の溶解度は、従来の未精製 DAST の溶解度より、約 9 % 小さくなっており、同量の DAST を溶かした場合、飽和点が数°C 上昇することが分かった。また、アレニウスプロットから活性化エネルギーを算出したところ、未精製および高純度 DAST のいずれも 34.8 kJ/mol であり、活性化エネルギーは等しかった。つまり、溶解度の変化は DAST の純度に起因するものと考えられる。
- 種結晶による DAST 結晶の育成において、結晶成長速度と結晶品質が強く相関していることを明らかにした。本実験では、最も低速で育成した DAST 結晶(成長速度 0.14 mm/day)の品質が、最良であった。分子構造が複雑な DAST の高品質結晶育成には、結晶を極めて低速で成長させることが、重要であることを明らかにした。

第2章 有機非線形光学結晶 DAST の育成

- 偏光顕微鏡による結晶の光学的均一性を調べた結果、成長速度が遅くなるほど消光度が高くなることが分かった。成長速度 0.4 mm/day 以下で育成した DAST 結晶は、結晶全体で一様に消光し、結晶の光学的均一性が優れていた。
- DAST (001)面の X 線回折ロッキングカーブ測定を行った結果、成長速度が遅くなるにつれて X 線回折ピークがより鋭くなり、分子配向性（結晶性）が向上することを明らかにした。最も低速で育成した DAST 結晶（成長速度 0.14 mm/day）が、最小の半値幅 37.4 秒を示した。ただし、本装置の入射 X 線の角度広がり、半値幅 5.2 秒であった。
- DAST (001)面のビッカース硬度測定を行った結果、結晶品質と硬度には密接な関係があることが分かった。X 線回折ロッキングカーブ半値幅が減少する（結晶成長速度が遅くなる）につれて、ビッカース硬度が増加し、最大値は 49 であった。この値は同じ有機イオン性結晶である LAP、THAMP、THAMS などと同程度あり、DAST 結晶がイオン結合に起因した比較的高い硬度を有していることを明らかにした。
- 自然核成長からの育成である Slope Nucleation 法において、下記の 4 つの改善策を行うことで高品質 DAST 結晶の育成が可能となった。得られた DAST (001)面の X 線回折ロッキングカーブ半値幅の最小値は 13 秒であり、無機高品質シリコン結晶 (111)面の半値幅 10.4 秒に迫る値であった。このような高品質 DAST 結晶の育成報告例はなく、今回が初めてである。
 - 未精製 DAST（純度 97%未満）をエタノールによる再結晶法にて精製することにより純度 99.9%の高純度 DAST 原料を得た。
 - DAST 濃度 35 g/l に調整した DAST 溶液 100 ml において、スターラーによる溶液攪拌を行いながら、55℃における加熱時間 t (hour)と導電率 D (S/cm)の関係を調べた。加熱時間とともに導電率が指数関数的に高くなり、10 時間を越えると導電率は飽和し、一定値となった。この過程を Noyes-Whitney-Nernst の溶解式で近似したところ、近似式 $D = 2.91\{1 - \exp(-0.73t)\}$ が得られ、実験値とよく一致した（相関係数 $R^2=0.992$ ）。つまり、溶液の導電率はクラスターの分解程度を表していると考えられる。この結果から、見かけ上、溶解している溶液でも、クラスターレベルになると十分に分解されておらず、この実験条件においては、その溶解に少なくとも 10 時間程度の加熱が必要であることが分かった。
 - 結晶析出開始後に溶液温度の保持、好ましくは析出開始前後において溶液温度を保持することで、析出開始後の結晶の急成長を抑制した。また、温度降下速度を一定とすることなく、結晶の成長状況を考慮した適度な温度降下を与え、可能な限り低速で結晶を成長させた。種結晶による DAST 結晶の育成において、結晶品質が成長速度に強く関連していたため、本改善策が高品質 DAST 結晶の育成に最も寄与したと考えられる。
 - フロリナートを用いた比重差溶媒洗浄法と超音波洗浄により、取り出しの際に結晶表面へ DAST 微結晶が付着する問題を解決し、表面付着物の極めて少ない DAST 結晶を得た。

参考文献

- [1] 佐々木孝友, 難波義治: 光学 **21** (1992) 284.
- [2] 佐々木孝友: オプトロニクス **3** (1990) 119.
- [3] 佐々木孝友: 光技術コンタクト **32** (1994) 693.
- [4] 佐々木孝友: Polyfile **3** (1996) 35.
- [5] H. Nakanishi, H. Matsuda, S. Okada and M. Kato: Proc. MRS Int. Meet. Advanced Materials **1** (1989) 97.
- [6] S.R. Marder, J.W. Perry and W.P. Schaefer: Science **245** (1989) 626.
- [7] J.W. Perry, S.R. Marder, K.J. Perry and E.T. Sleva: Nonlinear Opt. Proper. Organic Matel. IV **1560** (1991) 302.
- [8] 安達宏昭: 大阪大学大学院工学研究科, 修士論文 (1998)
- [9] S.R. Marder, J.W. Perry and C.P. Yakymyshyn: Chem. Mater. **6** (1994) 1137.
- [10] G.L. Bryant, C.P. Yakymyshyn and K.R. Stewart: Acta Cryst. **C49** (1993) 350.
- [11] 例えば、日本結晶成長学会「結晶成長バンドブック」編集委員会編: 結晶成長ハンドブック, 共立出版 (1995)
- [12] H. Oikawa, S. Fujita, H. Kasai, S. Okada, S.K. Tripathy and H. Nakanishi: Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects **169** (2000) 251.
- [13] F. Pan, M.S. Wong, C. Bosshard and P. Günter: Advanced Materials **8** (1996) 592.
- [14] X.-C. Zhang, X.F. Ma, Y. Jin, T.-M. Lu, E.P. Boden, P.D. Phelps, K.R. Stewart and C.P. Yakymyshyn: Appl. Phys. Lett. **61** (1992) 3080.
- [15] 永妻忠夫, 滝沢孝充, 横尾篤, 戒能俊邦: 1996 年電子情報通信学会エレクトロニクスソサイエティ大会予稿集 (1996) C-221.
- [16] K. Takayama, M. Yoshida, H.-H. Deng, K. Komatsu and T. Kaino: Nonlinear Optics **25** (2000) 413.
- [17] 気賀沢和義, 相馬俊一, 谷内哲夫, 伊藤弘昌: 第 58 回応用物理学会学術講演会講演予稿集 No.3 (1997) 1215.
- [18] D. Xu, M. Jiang and Z. Tan: Acta Chemica Sinica **41** (1983) 570.
- [19] M. KH. Rabinovich 著, 久保田護訳: 金属の構造と強さ, 東京図書 (1965)
- [20] 小野利一, 神村共住, 福本悟, 西岡志行, 吉村政志, 森勇介, 佐々木孝友: レーザー研究 **30** (2002) 538.
- [21] Y. Namba, R. Wada, K. Unno and A. Tsuboi: Annals of the CIRP **38** (1989) 331.
- [22] 後藤義隆, 林昭男, 中山雅陽, 渡辺敏行, 宮田清蔵, 本田一匡, 後藤みどり: 日本化学誌 **9** (1990) 968.
- [23] 難波義治, 佐伯守彦, 佐々木孝友, 後藤義隆: 1991 年精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集 (1991) 67.
- [24] 難波義治, 佐伯守彦, 佐々木孝友, 後藤義隆: 精密工学会誌 **61** (1995) 813.
- [25] H. Kagawa, M. Sagawa, A. Kakuta, M. Kaji, M. Saeki and Y. Namba: Appl. Opt. **34** (1995) 3421.
- [26] 小山祥, 難波義治: 平成 13 年度中部大学工学部機械工学科精密工学研究室研究成果発表会講演論文集 (2002) 22.
- [27] 孫永睦, 大崎直樹, 小林大樹, 金子進一, 伊藤弘昌, 小山祥, 難波義治: 第 49 回応用物理学関係連合講演会講演予稿集 No.3 (2002) 1257.

第2章 有機非線形光学結晶 DAST の育成

- [28] H. Nanjo, P. Qian, N. Sanada, T.M. Suzuki, H. Takahashi, H. Ito and K. Komatsu: *Optics Lett.* **25** (2000) 1107.
- [29] H. Nanjo, P. Qian, N. Sanada, T.M. Suzuki, K. Komatsu, H. Takahashi and H. Ito: *Jpn. J. Appl. Phys.* **40** (2001) 4556.
- [30] N.P. Zaitseva, J.J. DeYoreo, M.R. Dehaven, R.L. Vital, K.E. Montgomery, M. Richardson and L.J. Atherton: *J. Cryst. Growth* **180** (1997) 255.
- [31] M. Nakatsuka, K. Fujioka, T. Kanabe and H. Fujita: *J. Cryst. Growth* **171** (1997) 531.
- [32] K. Fujioka, S. Matsuo, T. Kanabe, H. Fujita and M. Nakatsuka: *J. Cryst. Growth* **181** (1997) 265.
- [33] 中塚正大, 藤岡加奈: *日本結晶成長学会誌* **26** (1999) 94.
- [34] N. Zaitseva and L. Carman: *Prog. Crystal Growth & Charact.* **43** (2001) 1.
- [35] 佐々木孝友: 結晶成長ハンドブック 2.6 節, 日本結晶成長学会「結晶成長ハンドブック」編集委員会編, 共立出版 (1995) 288.
- [36] 佐々木孝友, 中井貞雄: *日本結晶成長学会誌* **16** (1989) 34.
- [37] 高橋義典: 大阪大学大学院工学研究科, 修士論文 (2000)
- [38] Y. Mori, Y. Takahashi, T. Iwai, M. Yoshimura, Y.K. Yap and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **39** (2000) L1006.
- [39] 黒田登志雄: 結晶は生きている, サイエンス社 (1984)
- [40] M.A. Larson and J. Garside: *J. Cryst. Growth* **76** (1986) 88.
- [41] I.M. Rusli, G.L. Schrader, M.A. Larson, *J. Cryst. Growth* **97** (1989) 345.
- [42] T. Azuma, K. Tsukamoto and I. Sunagawa, *J. Cryst. Growth* **98** (1989) 371.
- [43] D.T.J. Hurle: *Handbook of Crystal Growth 1A*, North-Holland, Amsterdam (1993)
- [44] W. Polak and K. Sangwal: *J. Cryst. Growth* **152** (1995) 182.
- [45] K. Onuma, A. Ito and T. Tateishi: *J. Cryst. Growth* **167** (1996) 773.
- [46] M. Bohenek, A.S. Myerson and W.M. Sun: *J. Cryst. Growth* **179** (1997) 213.
- [47] S. Kim, A.S. Myerson and M. Kohl: *J. Cryst. Growth* **181** (1997) 61.
- [48] L. Li and T. Ogawa: *J. Cryst. Growth* **211** (2000) 286.
- [49] R. Mohan, O. Kaytancioglu and A.S. Myerson: *J. Cryst. Growth* **217** (2000) 393.
- [50] 渡辺隆裕: 大阪大学大学院工学研究科, 修士論文 (2002)
- [51] F. Tsunesada, T. Iwai, T. Watanabe, H. Adachi, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *J. Cryst. Growth* **237-239** (2002) 2104.
- [52] 安達宏昭, 細川陽一郎, 高野和文, 常定扶美, 増原宏, 吉村政志, 森勇介, 佐々木孝友: *日本結晶成長学会誌* **29** (2002) 445.
- [53] D. W. Oxtoby: *Nature* **420** (2002) 277.

第 3 章

DAST の電気光学素子への応用

3.1 はじめに

有機非線形光学結晶 DAST は優れた非線形特性や高速応答を有するといわれ、電気光学効果を利用した電界センサー、光変調器、光スイッチや、非線形光学効果を利用したレーザー光の波長変換、テラヘルツ電磁波発生などの素子において、従来使用されてきた無機系の非線形光学結晶で実現される性能を上回る素子開発が期待されており、本学を始め、東北大学、スイス連邦工科大学、理化学研究所、日本電信電話株式会社(NTT)などの多くの研究機関で各種素子動作の検討が行われてきた[1-21]。また、Rainbow Photonics (スイス)、Molecular OptoElectronics Corporation (米国)などから DAST 結晶が販売されるなど、DAST への期待と需要は高まっている。しかしながら、結晶品質やデバイス加工の問題から、現在のところまだ実用化には至っていない。

本研究では、Slope Nucleation 法により高品質 DAST 結晶の育成を初めて可能とした。ただし、得られる結晶の大きさは数ミリ角程度の小型結晶に限られる。この結晶形状を活かせる応用例の一つに電気光学効果を利用した電界センサーが挙げられる。著者は、電界計測として最も広く利用され、集積回路(IC: Integrated Circuit)の故障診断などへの実用化が進んでいる電気光学プローブに着目した。現在、市販されている電気光学プローブに用いられている電気光学結晶は、最大でも数ミリ角であることから、Slope Nucleation 法で得られる小型 DAST 結晶にて、その実用化が可能である。本章では、DAST 結晶を用いた電気光学プロービングによる電界測定を行うことで、DAST の電気光学特性を評価し、次世代電界センサーへの可能性について検討する。

3.2 電気光学結晶を用いた電界センサー

3.2.1 電界センサーの基本原理

電界 E の印加により結晶の屈折率楕円体の変形や回転が起こり、屈折率のテンソル成分が変化

第3章 DASTの電気光学素子への応用

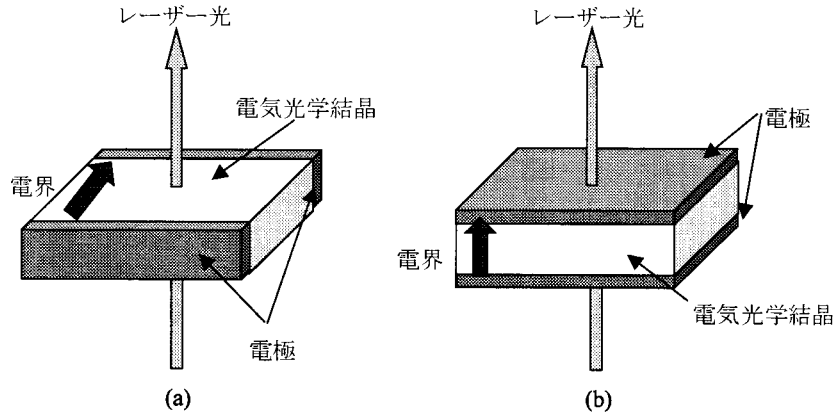


図 3.1 電気光学効果を用いた電界センサー
(a)横電界検出と(b)縦電界検出

する現象を電気光学効果という。ここでは、電気光学効果を利用した電界センサーについて説明する。電気光学結晶による電界センサーは、電界による電気光学結晶の複屈折率変化を、レーザー光を用いて検出する素子である。その特長として、①光を用いた測定系のため高速応答が可能であること、②センサー部分に電源を必要としないこと、③非金属であることから近傍電磁界への影響が少ないことなどが挙げられる。電界センサーは、電気信号で光信号を変調することと等価であり、その電界検出方法には図 3.1 に示す 2 種類の方法がある。レーザー光の進行方向に垂直な電界を検出する横電界検出と、平行な電界を検出する縦電界検出である。ここでは、図 3.2 に示す横型電気光学変調器を例に挙げ、DAST を用いた電界センサーの基本原理を説明する。

光学的に異方性をもつ結晶中を進む光（波長 λ ）の位相速度は、入射光の偏波方向によって異なる。光軸以外に入射した光は、屈折率楕円体上で 2 つの異なった屈折率 n_1 と n_2 を感じて、それぞれ異なった位相速度で伝播するので、結晶（結晶長を L とする）の出口では 2 つの偏波光の間で位相差 δ

$$\delta = \frac{2\pi|n_1 - n_2|}{\lambda} \cdot L \quad (\text{式 3.1})$$

が生じる。電気光学結晶による光変調は、外部電界の印加によって変化した屈折率楕円体から生じる位相差を制御するのが基本となる。電界印加による屈折率楕円体は

$$(B_{ij} + r_{ijk}E_k + R_{ijkl}E_kE_l)x_ix_j = 1 \quad (\text{式 3.2})$$

と表される。 r は 1 次の電気光学定数(ポッケルス定数)、 R は 2 次の電気光学定数(カー定数)である。電界センサーや光変調器、光スイッチは電界の 1 乗に比例するポッケルス効果を利用したものである。1 次の電気光学定数による屈折率変化は

$$\Delta\left(\frac{1}{n_{ij}^2}\right) = \Delta B_{ij} = r_{ijk}E_k \quad (\text{式 3.3})$$

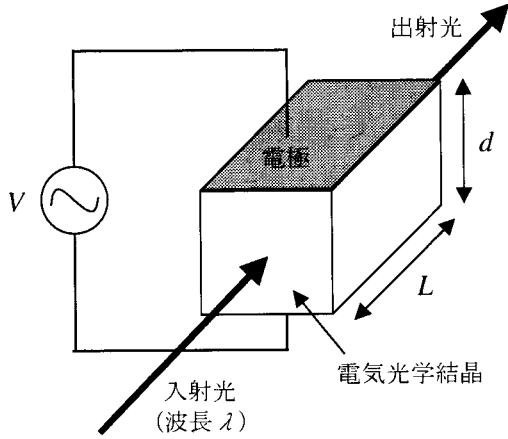


図 3.2 横型電気光学変調器

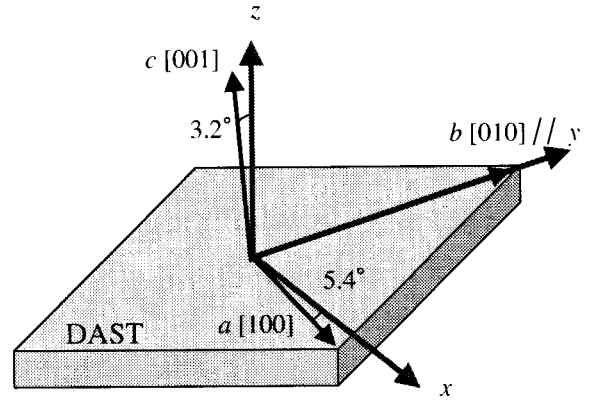


図 3.3 DAST の結晶軸と光学弾性軸

となる。 r は 3 階のテンソル量で、添字の (ij) を $(11) \rightarrow 1$ 、 $(22) \rightarrow 2$ 、 $(33) \rightarrow 3$ 、 $(23) \rightarrow 4$ 、 $(31) \rightarrow 5$ 、 $(12) \rightarrow 6$ のように慣例的表示をとると、 6×3 のマトリクスになる。 r の成分相互の関係は点群によって決まっており、DAST の場合は単斜晶系の点群 m に属するから

$$\begin{pmatrix} r_{11} & 0 & r_{13} \\ r_{21} & 0 & r_{23} \\ r_{31} & 0 & r_{33} \\ 0 & r_{42} & 0 \\ r_{51} & 0 & r_{53} \\ 0 & r_{62} & 0 \end{pmatrix} \quad (\text{式 3.4})$$

となる。DAST の有する最大の r 定数はテンソル成分 r_{11} であるため[22]、これを利用するには x 軸方向に電界がかかるようにすればよい。DAST は平板状の結晶が得られやすく、図 3.3 に示す結晶軸と光学弾性軸の関係[23]から、ほぼ a 軸方向に電界がかかるように結晶を配置させる。レーザー光を DAST 結晶の z 軸方向から入射した場合、 z 軸方向の光波の電界は 0 となるので、屈折率楕円体は

$$B_{11}x^2 + B_{22}y^2 + 2B_{12}xy = 1 \quad (\text{式 3.5})$$

となり、電界が x 軸方向に印加されていることを考慮すると

$$B_{11} = r_{11}E_x + \frac{1}{n_x^2}, \quad B_{22} = r_{21}E_x + \frac{1}{n_y^2}, \quad B_{12} = 0 \quad (\text{式 3.6})$$

これらを(式 3.5)に代入すると、 xy 平面での屈折率は次式のように表される。

$$\left(r_{11}E_x + \frac{1}{n_x^2} \right) x^2 + \left(r_{21}E_x + \frac{1}{n_y^2} \right) y^2 = 1 \quad (\text{式 3.7})$$

第3章 DAST の電気光学素子への応用

ここで $|r_{11}n_x^2E_x|, |r_{21}n_y^2E_x| \ll 1$ であるから

$$\frac{1}{1-2\delta} \cong \frac{1}{(1-\delta)^2} \quad (\delta \ll 1) \quad (式 3.8)$$

の近似式を適応して(式 3.7)は次式となる。

$$\frac{x^2}{n_x^2 \left(1 - \frac{1}{2}r_{11}n_x^2E_x\right)^2} + \frac{y^2}{n_y^2 \left(1 - \frac{1}{2}r_{21}n_y^2E_x\right)^2} = 1 \quad (式 3.9)$$

この場合、電界印加によって結晶の主軸回転は起こらず、屈折率楕円体が収縮もしくは膨張するだけである。屈折率変化はそれぞれ

$$\Delta n_x = \frac{1}{2}r_{11}n_x^3E_x, \quad \Delta n_y = \frac{1}{2}r_{21}n_y^3E_x \quad (式 3.10)$$

である。(式 3.1)より位相差 δ は

$$\delta = \frac{2\pi L}{\lambda}(n_x - n_y) + \frac{\pi}{\lambda}(r_{11}n_x^3 - r_{21}n_y^3)\frac{V}{d}L \quad (式 3.11)$$

となる。ここで d は電極間隔、 V は印加電圧である。右辺第 1 項は結晶の自然複屈折による位相差であるが、位相補償用波長板を挿入することで相殺できる。つまり、右辺第 2 項が電圧印加による位相変調に寄与する。実際の測定では、位相差を 2 つの直交させた偏光子を用いて光強度に変換し、フォトダイオードで測定する。その強度 I は

$$I = I_0 \sin^2 \left\{ \frac{\pi}{\lambda} (r_{11}n_x^3 - r_{21}n_y^3) \frac{L}{d} \right\} V \quad (式 3.12)$$

となる。ここで、 I_0 は入射光強度で、位相差を電圧 V により 0 から π まで変化させることで、出力光強度 I を 0 から I_0 まで制御できる。特に、 π の位相差を与える電圧を半波長電圧 V_π といい

$$V_\pi = \frac{\lambda}{(r_{11}n_x^3 - r_{21}n_y^3)} \cdot \frac{d}{L} \quad (式 3.13)$$

で表わされる。一方、電界センサーとして用いるときは、出力光強度から印加電圧、つまり電界を算出できる。DAST の場合、 $|r_{11}n_x^3 - r_{21}n_y^3|$ が電気光学性能を表す値であり、この値が大きいほど位相差が大きくなり、電気光学デバイスとしての性能が良い。この性能指数は、材料の種類に大きく依存する。

3.2.2 電気光学プロービングによる電界計測

近年、電気光学プロービングと呼ばれるフォトニック技術を用いた電気信号の検出が実用化され始めている[24]。例えば、半導体電子部品、特に IC の検査を行う場合、従来はオシロスコープなどを用いて、高集積化された $0.5 \sim 10 \mu\text{m}$ の非常に細い配線に対して、先端径が $0.1 \sim 2 \mu\text{m}$ 程度

の金属針を接触させて、電気信号出力を測定していた。しかしながら、この方法ではせいぜい 1 GHz 程度の信号までしか取りだせない。また、配線に接触した金属は、電気信号の新しいパスを作ることになるため、IC の動作に影響を及ぼすことがある。つまり、広帯域性と高入力インピーダンスを、同時に実現することは困難であった[25]。

一方、電気光学プロービングによる測定では、フォトニック計測の特長である広帯域（高時間分解能）性と被測定系に対する低擾乱性（高入力インピーダンス）を有する。この方法では、光パルスを用いてサンプリング計測する電気光学サンプリング(EOS: Electro-Optic Sampling)[26,27]や、連続光を用いて高速フォトダイオードにより電気信号に変換した後、電気的なサンプリングオシロスコープなどで波形を計測すること[28]が可能である。

電気光学プロービングによる IC やプリント回路基板の電界計測の方法は、配線間で水平電界を検出する横電界プロービングと、配線直上で垂直電界を検出する縦電界プロービングがある(図 3.4)。例えば、横電界プロービングは、コプレーナ線路のような共平面回路からなるモノリシックマイクロ波集積回路(MMIC: Monolithic Microwave Integrated Circuit)に、縦電界プローブは配線そのものの検出などに適応できる。電気光学結晶は特定方向の電界に対してのみ感度を有するので、その選択が必要となる。DAST の場合、最大の r テンソル成分が r_{11} であるため、 x 軸方向の電界に対して感度が優れることと、得られる結晶形状を考慮すると、横電界プロービングに適した材料である。

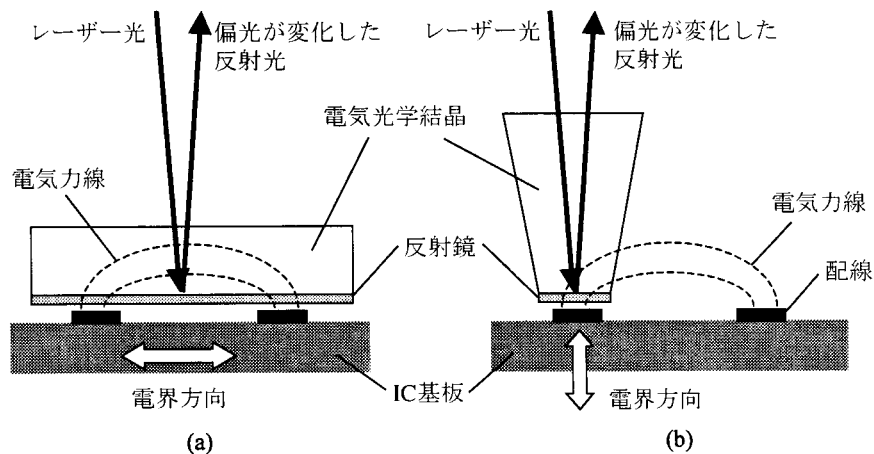


図 3.4 電気光学プロービングによる電界計測
(a)横電界プロービングと(b)縦電界プロービング

3.2.3 電気光学結晶

代表的な電気光学結晶とその特性を表 3.1 にまとめた[25,29]。電気光学結晶に要求される因子として、①電気光学定数 r 、②屈折率 n 、③誘電率 ϵ 、④抵抗率 ρ 、⑤使用するレーザー光の波長に対する吸収、⑥研磨、研削やミラーなどの膜蒸着などの加工性などが挙げられる。一般に、電界に対する電気光学結晶の屈折率変化が $n^3 r$ に比例することから、この値が感度の目安として使用される。また、非接触で測定する場合、誘電率 ϵ の結晶に印加される電界は E/ϵ となる。そこで電気光学結晶の感度指数として、 $n^3 r/\epsilon$ を用いることもある。一方、抵抗率に関しては、低周波数

第3章 DASTの電気光学素子への応用

表 3.1 代表的な電気光学結晶の諸特性[25,29]

結晶	電気光学定数 r (pm/V)	屈折率 n	誘電率 ε	n^3r (pm/V)	n^3r/ε (pm/V)	電界 方向
LiTaO ₃	30.3	2.18	43	314	7.3	横
LiNbO ₃	30.8	2.20	28	328	12	横・縦
GaAs	1.2	3.5	13	51	4	縦
ZnTe	4.3	3.1	10	128	13	縦
CdTe	6.8	2.8	9.4	149	16	縦
KD ₂ PO ₄ (KD*P)	24	1.51	48	83	1.7	縦
KTiOPO ₄ (KTP)	36.3	1.86	15.4	234	15	横・縦
Bi ₁₂ SiO ₂₀ (BSO)	5.0	2.60	56	88	1.6	縦
Bi ₁₂ TiO ₂₀ (BTO)	5.7	2.70	47	112	2.4	縦
DAST	92	2.52	5.2	1472	283	横

領域での応答特性に関係する。高速 IC プローバーの用途に使用されている ZnTe、CdTe などの半導体は n^3r が比較的大きく、 ε が小さいという利点を有するが、抵抗率が $10^9 \sim 10^{10} \Omega \cdot \text{cm}$ と低いため、およそ 1 MHz より低い周波数の電界は、自由電子によってスクリーンアウトされてしまい感度が減少する[25]。また、酸化物結晶の Bi₁₂SiO₂₀ (BSO)、Bi₁₂TiO₂₀ (BTO)は、抵抗率が $10^{14} \sim 10^{15} \Omega \cdot \text{cm}$ と高く、低周波数領域まで応答する[30]。しかしながら、誘電率が 50 程度と高いため、感度指数 n^3r/ε が小さくなる。

現在のところ、電気光学プロービングによる電界計測には、縦型材料は CdTe、横型材料は KTiOPO₄ (KTP)が用いられる場合が多い。電気光学プロービング技術の発展には、より高い性能を有する電気光学結晶が必要不可欠であり、その候補の一つとして有機非線形光学結晶 DAST が注目されている。表 3.1 に示すように、 n^3r が非常に大きく、 ε が小さいことから、DAST の感度指数 n^3r/ε は、従来の電気光学結晶に比べて1桁以上大きい。また、有機材料は絶縁体であることから、低周波数領域での応答も期待できる。

3.3 DAST の電気光学特性

電気光学プロービングによる電界計測において、DAST 結晶の z 軸方向からレーザー光を入射し、電界が x 軸方向にかかる場合(横電界プロービング)、 $|r_{11}n_x^3 - r_{21}n_y^3|$ が電気光学性能を表す値であることは3.2.1 節で述べた。本節では、既に報告されている実験値から、DAST の電気光学性能を理論的に検討する。

DAST の主屈折率は、次式の Sellmeier 方程式にて表される[29,31]。

$$\begin{aligned}
 n_x^2 - 1 &= \frac{20.3706 \times 10^{30}}{(3.521 \times 10^{15})^2 - \left(\frac{6\pi \times 10^{14}}{\lambda}\right)^2} + 1.675 \\
 n_y^2 - 1 &= \frac{6.562 \times 10^{30}}{(3.744 \times 10^{15})^2 - \left(\frac{6\pi \times 10^{14}}{\lambda}\right)^2} + 1.042 \\
 n_z^2 - 1 &= \frac{3.309 \times 10^{30}}{(3.76 \times 10^{15})^2 - \left(\frac{6\pi \times 10^{14}}{\lambda}\right)^2} + 1.218
 \end{aligned} \tag{式 3.14}$$

ここで、 λ (μm) は波長を表す。DAST の c 軸方向の透過スペクトル(結晶厚 0.40 mm の as-grown 結晶)を図 3.5 に示す。DAST は波長領域 600～1650 nm において透明である。一方、電気光学定数 r_{11} 、 r_{21} については、F. Pan らによって報告された値[29]を用いた。屈折率と電気光学定数は、それぞれに波長分散があることから、主要な波長における計算結果を表 3.2 にまとめた。波長 720 nm における $|r_{11}n_x^3 - r_{21}n_y^3|$ の値は、1550 nm の値に比べて、約 3 倍大きい。この結果から、より短波長のレーザー光源をプロービング光として用いることで、DAST の電気光学性能が向上することが分かる。しかしながら、電気光学プロービングに用いられるレーザー光源は、半導体レーザーが一般的であり、そのレーザー波長は近赤外の 1.55 μm が多い。

一方、DAST の電気光学定数は各文献により値が異なる。例えば、最大の電気光学定数テンソル成分 r_{11} の値($\lambda=720$ nm)は、530 pm/V [32]という非常に大きな値から、92 pm/V [29]の報告例まで

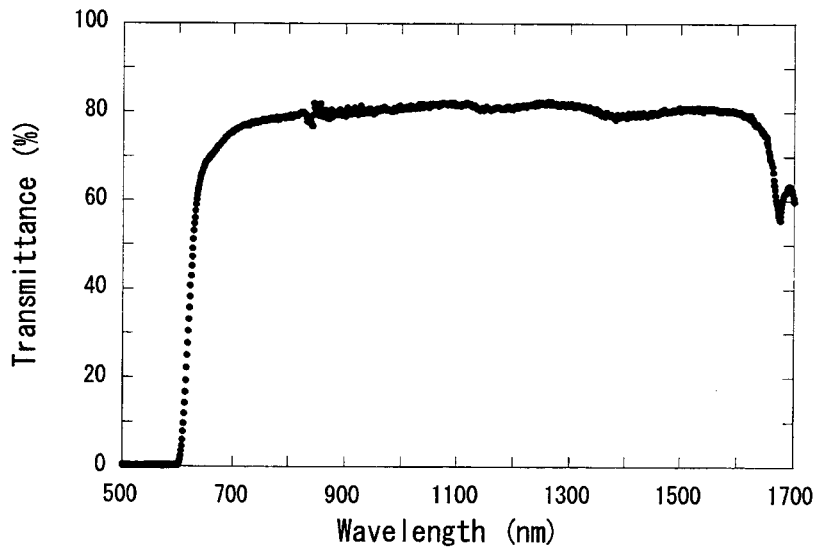


図 3.5 DAST 結晶の c 軸方向における透過スペクトル

表 3.2 DAST の電気光学プロービングに関わる性能因子

波長 (nm)	電気光学定数 r_{11}, r_{21} (pm/V)	屈折率 n_x, n_y	$r_{11}n_x^3 - r_{21}n_y^3$ (pm/V)
720	92, 60	2.520, 1.720	1167
800	77, 42	2.377, 1.678	836
1064	62, 28	2.208, 1.626	457
1313	53, 25	2.155, 1.610	426
1550	47, 21	2.131, 1.602	368

5 倍程度も値が異なる。これは、結晶品質に因るところが大きいと考えられる。DAST の電気光学特性については未確定な部分が多く、品質の良い結晶を用いた電気光学評価が必要である。そのため、本研究で得られた高品質 DAST 結晶を用いて電気光学特性を評価し、DAST の電気光学素子応用への可能性について検討した。

3.4 反射型測定系を用いた DAST の電気光学評価

本節では、Slope Nucleation 法により得られた高品質 DAST 結晶の電気光学評価について述べる。一般的に使用されている反射型の測定系(図 3.4)を用いて、電気光学プロービングによる電界測定を行うことで、DAST の電気光学特性を評価した。無機非線形光学結晶 KTP との比較により DAST の優れた電気光学性能を明らかにする。

3.4.1 電気光学感度評価

電気光学プロービングによる電界測定は、図 3.6 に示す簡易型電気光学マニュアルプローバーを用いて行った。この装置は、除震台と石定盤上に設置された電気光学測定系、観察光学系、電動ステージなどにより構成されており、対物レンズにて電気光学結晶にレーザー光を集光照射して、電界強度変化により偏光変化した戻り光を検出する反射型の電界センサーである。電動ステージにて電気光学結晶と測定回路基板を移動させることにより、レーザー照射位置、つまり電界測定位置を調整できる。また、赤外線カメラ、照明光源にて、基板上の配線やレーザー光の照射位置、電気光学結晶での光散乱などをモニター上で観察できる。レーザー光源として波長 $1.55 \mu\text{m}$ の半導体レーザーを使用し、その連続光による電気光学プロービングを行った。偏光変化した戻り光は、偏光子により光強度に変換した後、フォトダイオード(PD: Photodiode)に入力して、スペクトラムアナライザー(周波数分解能 $\Delta f = 1.95 \text{ Hz}$)にて電気光学信号を検出した。

DAST は横電界検出材料として期待されているので、横型材料の中で最も優れた電気光学特性

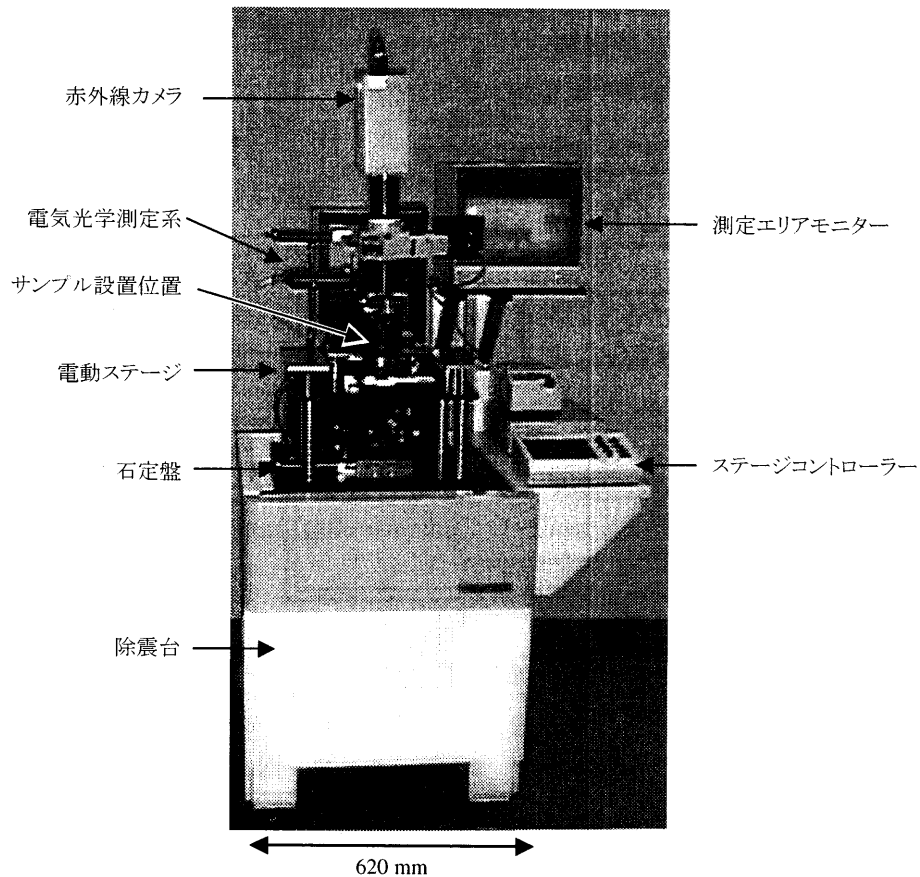
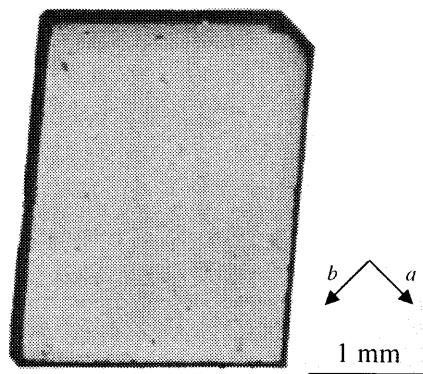


図 3.6 電気光学プローバー装置の概観写真

を有する市販 KTP[33]を標準結晶とし、電気光学感度を比較した。KTP 結晶は、結晶主軸方向の大きさが $1 \times 0.5 \times 2 \text{ mm}^3$ (a, b, c)であり、 b 面を光学研磨した。一方、DAST 結晶は as-grown (未研磨)で、大きさが $3.0 \times 2.3 \times 0.24 \text{ mm}^3$ のものを用いた(図 3.7)。コプレーナー線路を形成したテスト IC 基板上に、DAST は a 軸方向、KTP は c 軸方向に電界がかかるように配置し、レーザー入射方向はそれぞれ c 軸方向、 b 軸方向とした(図 3.8)。信号線($20 \text{ }\mu\text{m}$ 幅)とグラウンドの間隔は $15 \text{ }\mu\text{m}$ であり、横方向の電界が最も大きくなる配線間の中央において、電界を測定した。レーザー光は IC 基板上に集光させ、焦点位置におけるレーザー光の直径は $10 \text{ }\mu\text{m}$ であった。今回の測定では、電


図 3.7 DAST 結晶 ($3.0 \times 2.3 \times 0.24 \text{ mm}^3$)

第3章 DAST の電気光学素子への応用

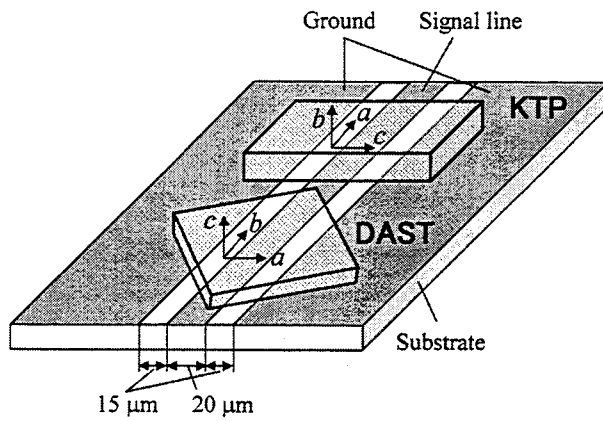


図 3.8 テスト IC 基板上での結晶配置

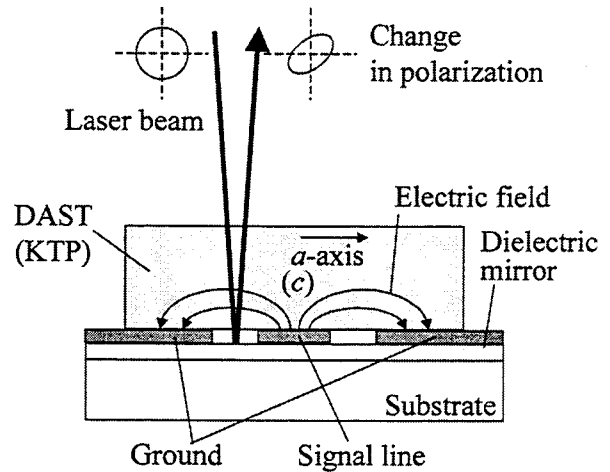


図 3.9 テスト IC 基板を用いた横電界の電気光学測定

気光学結晶に反射ミラーを形成してないため、誘電体ミラーをコーティングしたテスト基板を用いて、レーザー光の反射効率を向上させた(図 3.9)。

赤外線カメラによる観察では、DAST 結晶および KTP 結晶による入射レーザー光の散乱が観測されず、また、結晶下の基板配線も明瞭に映った。従来の DAST 結晶においては、クラックや内部欠陥などにより配線パターンが明瞭に観察できず、レーザー光が著しく散乱されるなどの問題点があった[34]。本研究で育成した DAST 結晶は、これらの問題が生ずることなく、光学的均一性や高い透明性を有する高品質結晶であることが分かった。

信号線に 1V、90 kHz の正弦波電圧を印加し、電気光学信号電圧を測定した。DAST 結晶から

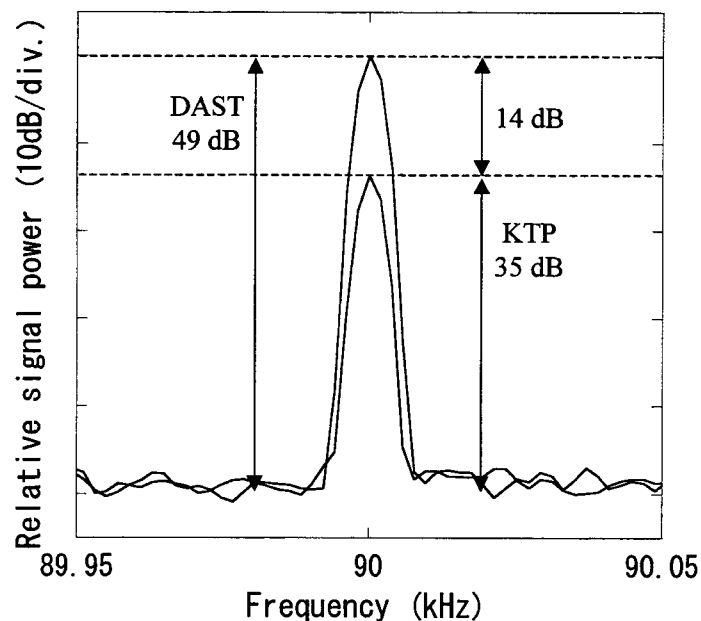


図 3.10 DAST と KTP の電気光学感度

得られた信号電圧の S/N (信号対ノイズ比)は 49 dB であったのに対し、KTP 結晶から得られた信号電圧の S/N は 35 dB であり、DAST による S/N の向上は 14 dB であった(図 3.10)。また、DAST 結晶 (001)と(001) 面 (結晶の裏表) において、電界の測定位置を移動させたが、得られた信号電圧は一定であった。これは、DAST 結晶の高品質性を示しており、3.5 節で詳しく述べる。

次に、最小検出電圧 $V_{\min}(\text{V}/\sqrt{\text{Hz}})$ を求めた。得られた信号電圧のピーク値、ノイズレベルをそれぞれ $X[\text{dBV}/\sqrt{\text{Hz}}]$, $N[\text{dBV}/\sqrt{\text{Hz}}]$ とし、振幅 A の正弦波信号を周波数分解能 Δf の測定器で検出した場合、最小検出電圧は

$$V_{\min} = \frac{A}{\sqrt{2\Delta f}} \times 10^{\frac{N-X}{20}} \quad (\text{式 3.15})$$

で表される。この式を用いて、図 3.10 に示した実験結果から、DAST および KTP の最小検出電圧を計算すると、それぞれ $3.7 \text{ mV}/\sqrt{\text{Hz}}$ 、 $18.0 \text{ mV}/\sqrt{\text{Hz}}$ となった。これらの結果から、DAST の電気光学感度は KTP に比べ、約 5 倍の大きさであることが分かった。5 倍の感度は、同じ S/N を得るのにかかる測定時間が、1/25 に短縮されることに相当する。これまでに、KTP と比較して 4 倍の感度が得られたという報告[34-36]が最高値であったが、本研究では、それを上回る結果が得られた。これは、DAST 結晶の品質が向上したためであると考えられる。

また、この実験条件における DAST と KTP の電気光学性能の理論値を比較検討する。DAST は a 軸方向、KTP は c 軸方向に電界を受け、また、レーザー入射方向はそれぞれ c 軸方向、 b 軸方向となるように、結晶を配置した。波長 $1.55 \mu\text{m}$ における電気光学性能を計算すると、DAST は $|r_{11}n_x^3 - r_{21}n_y^3| = 368 \text{ pm/V}$ [29], KTP は $|r_{33}n_z^3 - r_{13}n_x^3| = 168 \text{ pm/V}$ [33,37]が得られた。つまり、DAST は KTP と比較して、理論的には 2.2 倍の感度が期待できる。しかしながら、実験結果では約 5 倍の感度を示した。これは、過去の実験で用いられた結晶との品質差や、DAST と KTP の誘電率の差により生じたと考えられる。特に、電気光学プロービングによる電界測定において、誘電率は容量的な負荷や被測定系に対する擾乱に関係があり、非接触で測定する場合、誘電率 ϵ の結晶に印加される電界は E/ϵ となる。それぞれの誘電率は 5.2 (DAST)、15.4 (KTP)であり、KTP の誘電率は DAST の 3 倍と大きく、これにより感度低下が生じたと考えられる。誘電率を考慮した電気光学結晶の感度目安として用いられている n^3r/ϵ を参考とし、上記で示した電気光学性能の値を誘電率で割ると、DAST は 71 pm/V 、KTP は 11 pm/V となる。この計算結果では、DAST の電気光学感度は KTP に比べて、約 6.5 倍の大きさであることを示しており、本実験で得られた測定結果を上回る。

今回の実験では、未研磨 DAST を使用しており、光学研磨した KTP と比較すると、明らかに結晶表面状態が劣っており、基板への密着度などの影響が、DAST の感度低下を引き起こしたと考えられる。狭い配線間隔 (数 $10 \mu\text{m}$ 程度) における電界計測では、基板と結晶との空間距離をミクロンオーダーで制御する必要があり、数 μm の空間距離の差が電気光学感度に影響を及ぼす[38-40]。従って、光学研磨した DAST 結晶では、より高い電気光学感度が期待できると考えられ

第3章 DAST の電気光学素子への応用

る。DAST の光学研磨については、現在検討中であるが、3 次非線形光学特性の光学実験において、正確な評価が可能な DAST 結晶の光学面を得るまでに至っている[41]。今後、光学研磨した DAST を用いて、電気光学評価を行う予定である。

3.4.2 周波数特性評価

前節と同じ測定系、同じ結晶を用いて、電気光学感度の周波数特性を評価した。ただし、KTP 結晶から得られる電気光学信号電圧が小さかったため、印加電圧を 5V に上げた。印加電圧の周波数を 30 Hz から 90 kHz まで変化させ、DAST と KTP から得られる電気光学信号電圧を測定した結果を図 3.11 に示す。グラフの各点は、それぞれの結晶において、90 kHz で得られた電気光学信号電圧の値で規格化した数値である。周波数が低くなるにつれて、KTP 結晶から得られる電気光学信号電圧は、急激に低下した。その減少幅は、180 Hz において 39 dB に達し、それ以下の周波数信号電圧では、電気光学信号電圧が得られなかった。一方、DAST 結晶では、180 Hz 以下の信号に対しても優れた電気光学信号電圧が得られ、測定周波数領域すべてにおいて、ほとんど一定 (-2 dB)であった。この結果から、DAST 結晶を用いた電気光学測定は、KTP 結晶では検出できない低周波数領域においても、優れた感度を得ることが可能であり、広帯域化が実現できることが分かった。

一般に、高い抵抗率を有する電気光学材料は、低周波数での応答特性に優れる。DAST は有機材料の特長である高絶縁性の材料であることから、抵抗率は極めて高い。一方、KTP 結晶においても、酸化物の一般的特長である絶縁性が期待できるが、抵抗率が $4 \times 10^8 \Omega \cdot \text{cm}$ (c 軸方向)であるという報告がある[33]。例えば、ZnTe、CdTe などの半導体は、抵抗率が $10^9 \sim 10^{10} \Omega \cdot \text{cm}$ と低い

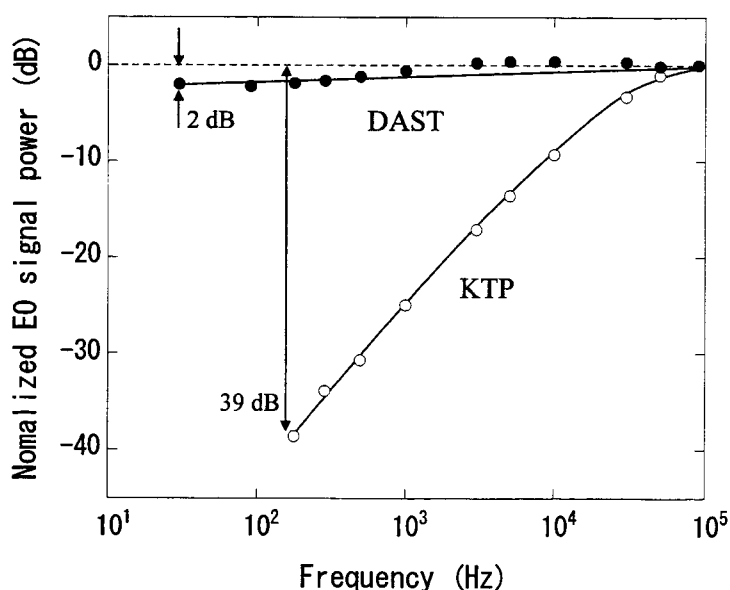


図 3.11 DAST(●)と KTP(○)の電気光学感度の周波数特性

ため、およそ 1 MHz より低い周波数の電界は、自由電子によってスクリーンアウトされてしまい感度が低下する[25]。市販されている EOS オシロスコープ AQ7700（安藤電気製）は、CdTe を電気光学結晶として使用しているため、その応答周波数帯域は、高周波数領域である 10 MHz～5 GHz (−3 dB) の信号測定に制限されている。これまでに、KTP 結晶の誘電率は、カリウムイオンの欠損に起因した周波数分散を有することが報告されている[33]。KTP 結晶のカリウムイオンは構造上非常に抜けやすい状態で束縛されており、強いカリウムイオン伝導性を示す[42,43]。そのため、低い周波数の電界に対して、カリウムイオンによる伝導性が顕著となり、誘電率が高くなったと考えられる。誘電率が高くなると、結晶に印加される電界 (E/ϵ) は小さくなる。これらの要因が、KTP 結晶における低周波数領域での電気光学感度を低下させたと考えられる。

3.4.3 高速電気信号の電気光学測定

DAST は分子内 π 電子による高速応答が可能なることから、超高速電気光学デバイスへの応用が期待されている。その応答速度は、無機結晶では実現が難しいとされるテラヘルツ (THz) 領域まで可能である[13-15,20,21]。さらに、本研究において DAST の低周波数領域における特長を初めて明らかにした。ここでは、実用化が期待される高速電気信号の電気光学測定を行い、高周波数領域における DAST の電気光学評価について述べる。

図 3.12 に高速電気信号測定の実験装置構成を示す。これは、前述した測定系と基本的に同じ構成であるが、本実験では、光パルスを用いてサンプリング計測する EOS にて、高速電気信号の波

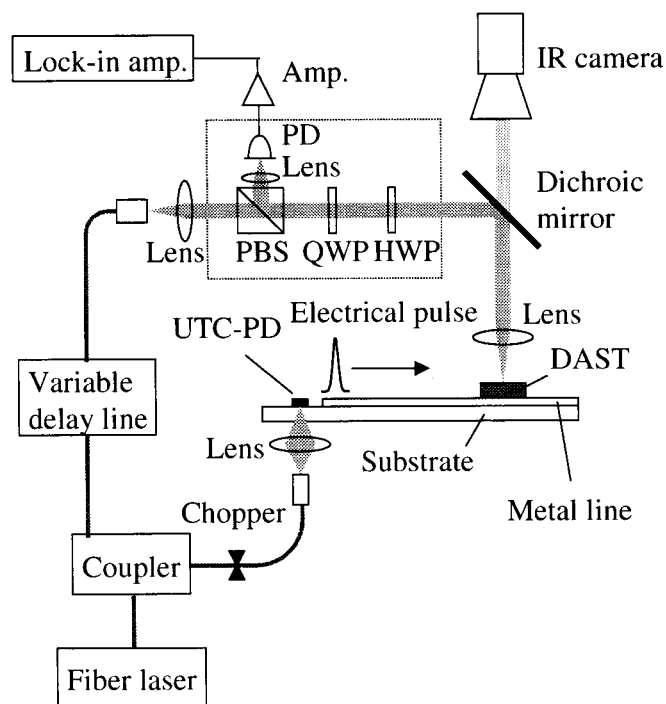


図 3.12 高速電気信号測定の実験装置構成

第 3 章 DAST の電気光学素子への応用

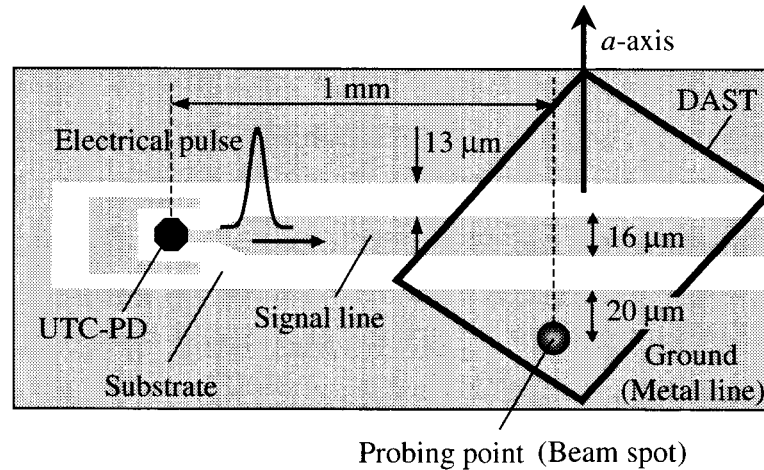


図 3.13 DUT 上における DAST 結晶の配置とプロービング位置

形を測定した。高速電気信号は、300 GHz を超える帯域を有する高速 PD である単一走行キャリア PD (UTC-PD: Uni-Traveling Carrier Photodiode) [44]に、パルス幅 500 fs、繰り返し周波数 100 MHz のファイバーレーザーからの光パルスを照射することにより高速電気パルスを発生させた。また、ファイバーレーザーからの光パルスは、EOS プローブ光としても使用した。DAST 結晶により偏光が変化した反射レーザー光は、楕円偏光を直線偏光に戻す 1/4 波長板(QWP: Quarter Wave Plate)と、直線偏光の偏光方向を調整する 1/2 波長板(HWP: Half Wave Plate)を通過した後、偏光ビームスプリッター(PBS: Polarizing Beam Splitter)にて入射レーザー光を分離し、反射レーザー光のみを PD に入力した。UTC-PD が組み込まれた DUT (Device Under Test)上における DAST 結晶の配置とプロービング位置を図 3.13 に示す。電気信号発生用光パルスが検出系に混入することを避けるため、UTC-PD から約 1 mm 離れた場所に DAST 結晶を配置した。また、この基板には反射ミラー(誘電体ミラー)が形成されていないため、横電界の最も大きな配線間の中央ではレーザーの反射光が十分に得られない。そのため、レーザー光の反射率が良いグランド電極上（電極端から 20 μm の場所）でプロービングを行った。しかしながら、グランド電極上では縦電界成分が大きく、横電界成分が極めて小さい。

DAST の EOS により得られた高速電気信号の測定波形を図 3.14 に示す。測定波形の立ち上がり時間(10~90 %)は 2.75 ps であり、半値幅(FWHM: Full-Width at Half-Maximum)は 5.56 ps であった。得られた信号波形は、元の光パルスよりもパルス幅が広がっているが、UTC-PD から発生した高速電気パルスが比較的長い距離(1 mm)を伝播することにより、電気パルスが鈍ってしまったと考えられる。そこで、検出したパルスをフーリエ変換することにより周波数解析を行ったところ、少なくとも 100 GHz 以上の周波数に相当することが分かった。DAST は 20 THz 以上の信号に対しても、応答が可能であることから[14,15]、高々 100 GHz の高速信号に対しては、十分に応答していると考えられる。つまり、本実験で得られた信号波形は、DAST の電気光学特性や EOS における影響(限界)ではなく、本測定に用いた DUT の特性により鈍ったパルス波形を、正確に検出した

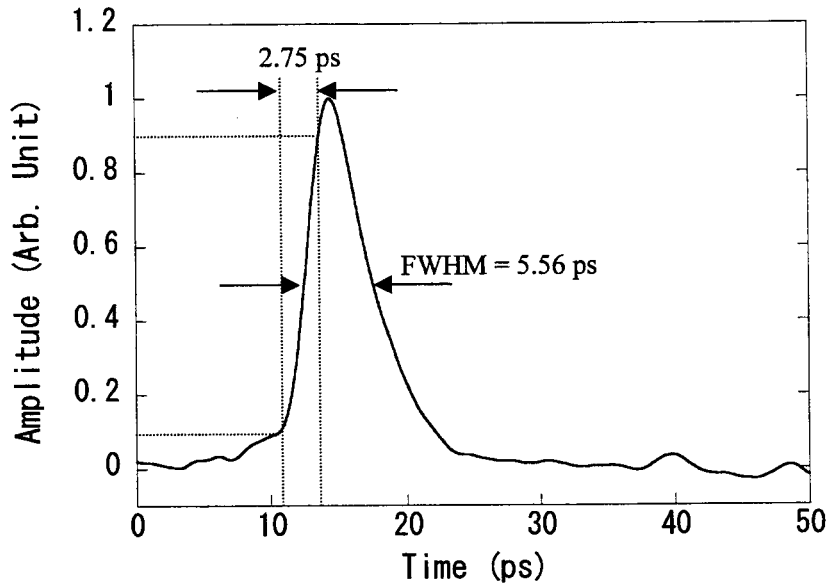


図 3.14 DAST 結晶で測定した高速電気信号波形

ものであると考える。

一方、KTP 結晶においても同様の実験を行ったが、高速電気信号の検出はできなかった。これはプロービング位置での横電界成分が極めて小さく、KTP 結晶の電気光学感度では、検出できなかったと考えられる。つまり、DAST は KTP と比較して、約 5 倍の高い電気光学感度を有することから、KTP 結晶では検出が困難であった微弱な電界においても、高速電気信号の高感度 EOS 検出が可能であることが分かった。

本研究では、DAST を用いることで低周波数(30 Hz)から高周波数(少なくとも 100 GHz)までの広帯域周波数に亘り、電界を高感度 (KTP に比べ約 5 倍@90 kHz) に検出できることを実証した。DAST は、従来の横電界検出材料として最も優れた特性を有する KTP の感度および周波数応答特性を大きく上回っており、これまで実現が困難であった超広帯域および超高感度電界センサーへの応用が可能であることを、今回初めて明らかにした。

3.5 透過型測定系を用いた DAST の電気光学評価

本節では、図 3.15 に示す透過型の光学測定系を用いて、DAST の電気光学特性を評価した結果について述べる。この測定系は、ガラス基板上に形成した 2 本の白金電極上 (電極間距離: 0.5 mm) に DAST 結晶を配置し、結晶にレーザー光を透過させることで、電界の検出を行う電気光学プロービングである。ガラス基板は光学定盤上に設置されたステージにより移動可能で、レンズで集光したレーザー光 (集光位置でのビーム直径: 約 70 μm) を任意の位置に照射できる。レーザー光源は Nd:YAG レーザー(波長 1.064 μm)の連続光を用い、レーザー照射位置は、同軸上に調整した

第3章 DAST の電気光学素子への応用

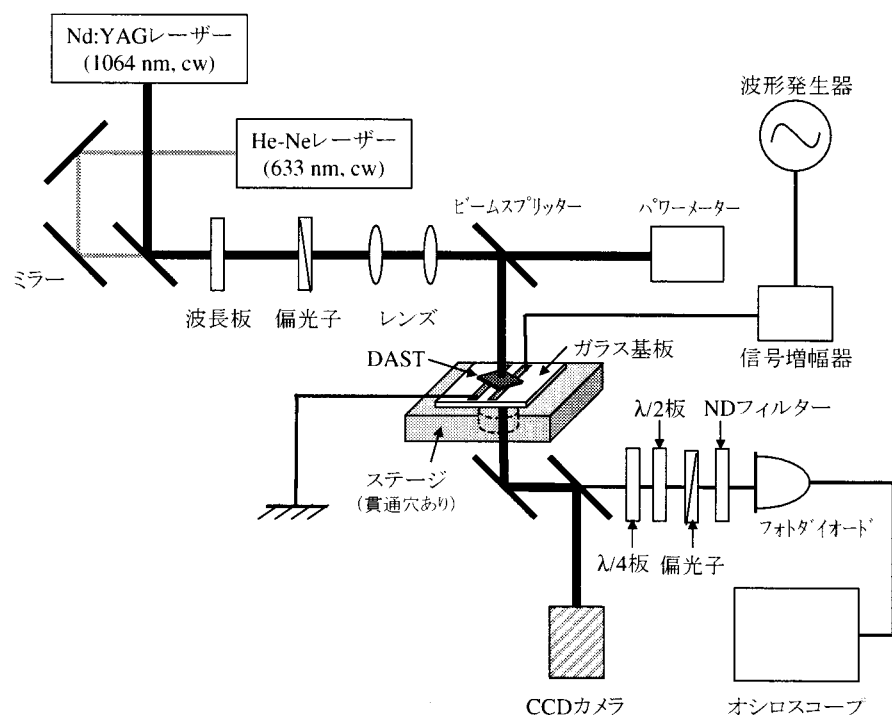


図 3.15 透過型の電気光学測定の実験装置構成

He-Ne レーザー光(波長 $0.633\ \mu\text{m}$: 可視光)により確認した。結晶を透過したレーザー光の散乱などの様子は、CCD カメラを用いて観察した。偏光変化した透過光は、偏光子により光強度に変換した後、PD に入力し、オシロスコープにて電気光学信号を測定した。本実験で用いた PD の周波数帯域が $30\ \text{kHz}$ までであったため、比較的低周波数領域での電気光学特性を評価した。

この測定系の利点は、①測定光学系が単純であること、②反射ミラーの形成や特殊なテスト基板が不要であること、③シングルパス評価のため、結晶の表面状態や平行度の影響が少ないことなどが挙げられる。そのため、as-grown 結晶の評価に適している。また、この電気光学測定システムは、X 線回折による結晶性の評価に比べて、①短時間で評価できる (X 線測定: 約 20 分、電気光学測定: 少なくとも 1 分以下)、②結晶内部の評価ができる (X 線測定では結晶表面付近の評価に限定される)、③結晶の微小領域における評価ができる (X 線測定: 数 mm 角、電気光学測定: 本実験では約 $70\ \mu\text{m}\ \phi$)、④デバイス性能評価 (レーザー透過率、電気光学感度) ができるなどの利点を有することから、本研究では、DAST 結晶の品質評価装置として積極的に使用した。

3.5.1 電気光学プロービングによる結晶品質評価

DAST の電気光学プロービングによる電気光学評価において、従来の報告では KTP と比較して約 4 倍の感度が得られたとの報告があった[34-36]。しかしながら、その感度は同一結晶内で大きくばらついており、最高感度が得られた測定点は、結晶のある一点に限られていた。本研究以前の Slope Nucleation 法により得られた DAST 結晶での測定結果を図 3.16 に示す[34]。グラフは、測

定位置を b 軸方向に A から B まで移動させたときの電気光学感度を示しているが、大きなばらつきが生じた。最高値 (KTP 結晶で得られた感度の約 4 倍) は結晶内のある 1 点のみで、ほとんどの点はその 50 % 以下の値であった。さらに、DAST 結晶によりレーザー光が著しく散乱されるなど、結晶品質に問題があった。そこで、本研究では DAST 結晶の高品質化を行うことで、これらの問題解決を目指した。

育成条件改善後の Slope Nucleation 法により得られた高品質 DAST 結晶の測定結果を図 3.17 に示す。電圧は正弦波 1 kHz、100 V を印加した。前節で KTP 比 5 倍の感度が得られた DAST 結晶

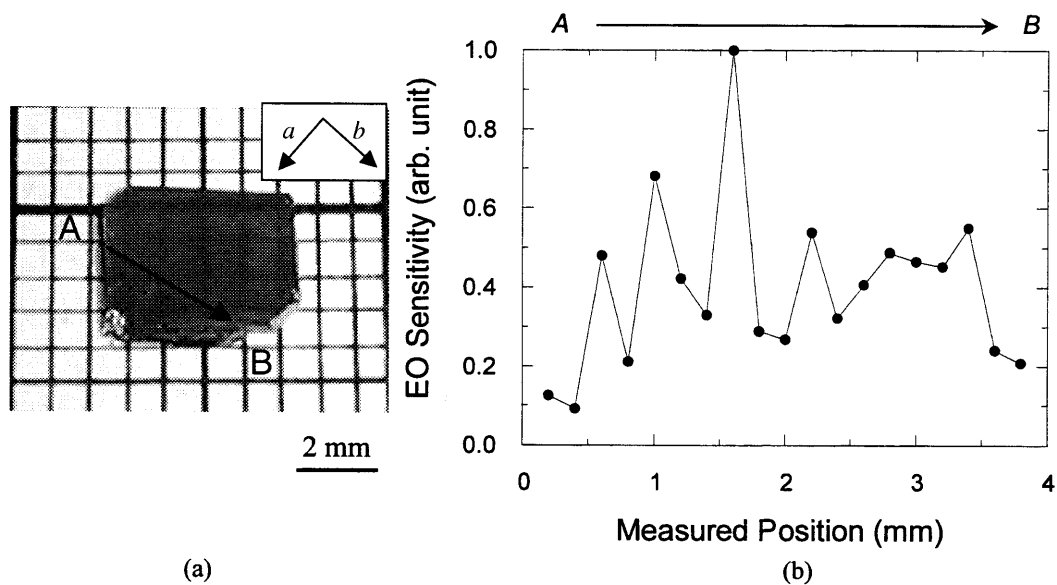


図 3.16 (a)従来の DAST 結晶と測定位置, (b)電気光学感度

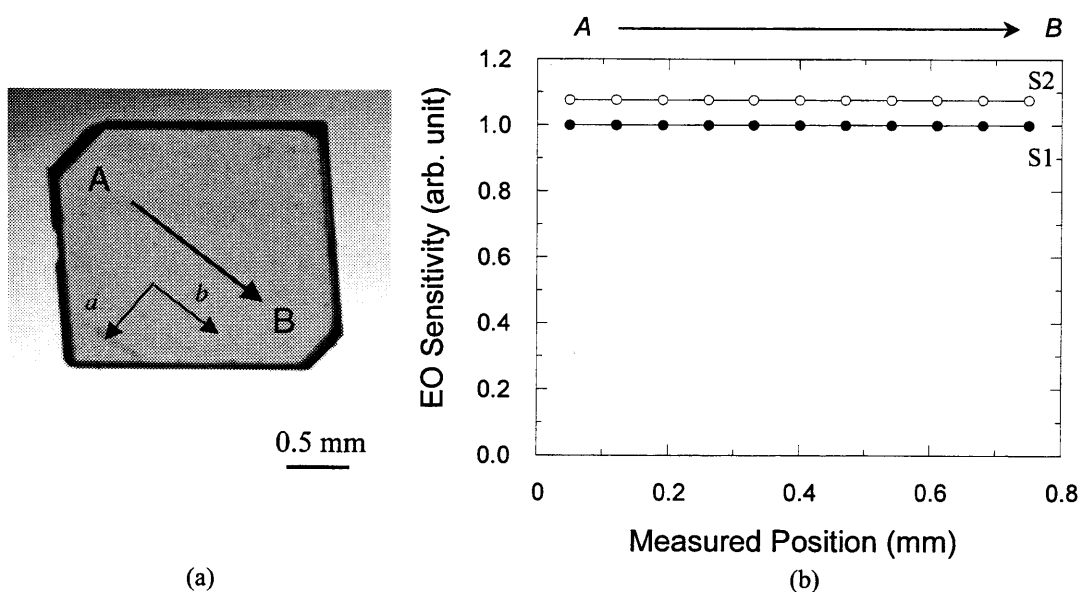


図 3.17 (a)高品質 DAST 結晶と測定位置, (b)電気光学感度

●S1 ($3.0 \times 2.3 \times 0.24 \text{ mm}^3$), ○S2 ($2.3 \times 2.0 \times 0.28 \text{ mm}^3$)

第3章 DAST の電気光学素子への応用

S1 ($3.0 \times 2.3 \times 0.24 \text{ mm}^3$ (図 3.7)) において、 b 軸方向に測定位置を移動させて電界を測定したところ、得られた電気光学信号電圧は一定、つまり電気光学感度が一定であった。同様に、別のサンプル S2 ($2.3 \times 2.0 \times 0.28 \text{ mm}^3$ (図 3.17)) において、 b 軸方向に A から B まで測定位置を移動させて測定した。得られた電気光学信号電圧は、すべての測定点において一定であり、従来の問題点であった同一結晶内での感度ばらつきは生じなかった。これは、DAST 結晶の高品質性を示す結果であり、特に結晶内部の均一性が向上したことにより実現されたと考える。

一方、透過レーザー光の空間強度分布 (CCD 画像) を図 3.18 に示す。この画像は結晶 (焦点) から 170 mm 離れた位置でのレーザー光を撮らえたものであるが、DAST 結晶によるレーザーの散乱は観測されず、KTP 結晶の場合と同じであった。レーザー強度の空間分布をガウシアンでフィッティングすることにより、ビーム直径 (ビーム中心強度の $1/e^2$ (13.5 %) 強度の直径) を計算した。入射レーザー光 (サンプルなし) の直径が 3.33 mm であったのに対し、DAST 結晶を透過したレーザー光の直径は 3.13 mm であった。つまり、ビームプロファイルに変化がなく、DAST 結晶によるレーザー光への悪影響は観測されなかった。この結果は、市販 KTP 結晶と同程度であり、光学的に優れた DAST 結晶が得られていることを明示している。

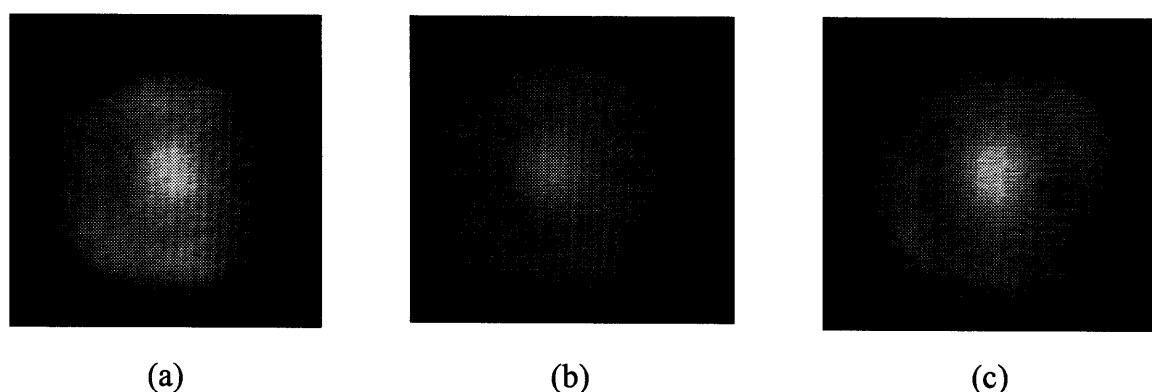


図 3.18 透過レーザー光の空間強度分布
(a)サンプルなし, (b)KTP, (c)DAST

3.5.2 結晶厚と電気光学感度

図 3.17 に示した S2 で得られた信号電圧は S1 に比べて若干大きかったが、これは結晶の厚さが異なるためである。(式 3.12)で示したように、S2 の結晶長が大きい分、強度変化が大きくなり、結果として、電気光学信号電圧が高くなったと考える。図 3.19 に結晶の厚さと電気光学感度 (得られた電気光学信号電圧) の関係を示した。電圧は正弦波 1 kHz、400 V を印加した。結晶が厚くなるにつれて、電気光学感度が高くなり、ほぼ比例関係 ($R^2=0.962$) であった。この測定系は電極間隔が 0.5 mm と大きく、印加電圧も高いことから、配線からの漏れ電界はある程度の高さ (少なくとも 1 mm) までしみだしていることが予想される。そのため、結晶には一様に電界が浸入してお

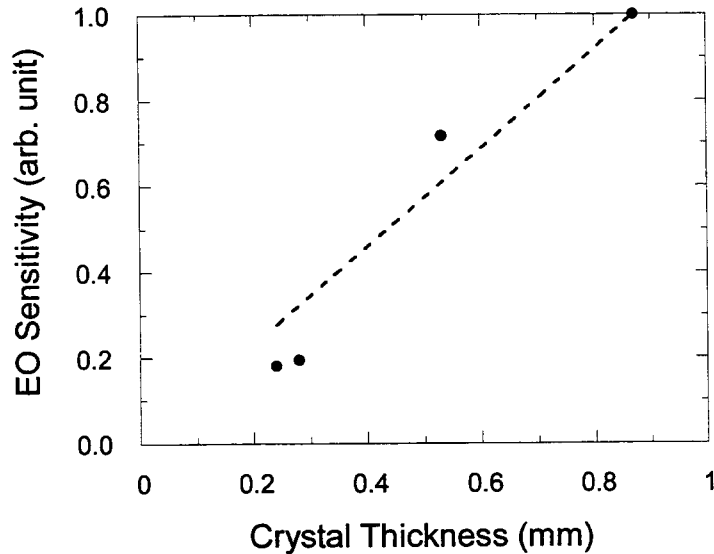


図 3.19 DAST 結晶の厚さと電気光学感度

り、結晶厚さに比例して、得られる電気光学感度が高くなったと考えられる。また、この結果は DAST 結晶の厚さが大きくなっても、高品質な結晶が得られていることを示している。

一方、3.4 節で用いた配線間隔が数 10 μm 程度の非常に狭い測定系では、配線からの漏れ電界はせいぜい 100 μm 程度の高さであり[38]、電気光学感度が結晶の厚さに比例しない。そのため、配線間隔が狭い IC 回路基板などの電界検出には、数 100 μm 程度の薄い結晶を用いた電界検出が適している。例えば、安藤電気製 EOS ブローバー AY4331 は、標準で厚さ 100 μm 、高感度タイプで厚さ 3 mm の CdTe が使用されている[45]。つまり、DAST 結晶を電界センサーとして用いる場合においても、測定環境や使用目的に応じた結晶厚を選択する必要があると考えられる。最近、薄膜 DAST 結晶の作製方法が提案され、厚さ数～数 10 μm 程度の結晶が得られたとの報告がある[32,46]。また、DAST の種結晶取り付け方向や溶液の過飽和度（過飽和度が高い溶液中では c 軸方向、過飽和度が低い溶液中では a 軸方向に成長しやすい）により、得られる結晶形状が異なることが分かっている[11,47,48]。一方、Slope Nucleation 法においては、溶液濃度を変化させることで DAST 結晶の形状が制御できる可能性があることを示した[49]。これらの育成手法を駆使することで、素子応用に求められる形状を有する DAST 結晶の作製が可能になると考えられる。

3.5.3 広帯域信号の電気光学測定

これまでの実験結果から、DAST 結晶を用いることにより、低周波数(30 Hz)から高周波数(少なくとも 100 GHz 以上)までの広帯域周波数に亘って、電界を検出できることを明らかにした。これまでに開発された電気光学結晶においては、広帯域周波数に亘る電界検出ができなかった。そのため、通信信号などのような周期性の乏しい信号や方形波などを正確に検出することが困難であった。ここでは、広帯域信号である方形波、三角波信号の波形測定を行い、DAST の電気光学特

第3章 DAST の電気光学素子への応用

性を評価した。

周期的ひずみ波はフーリエ級数に展開できることから、有限個の正弦波と直流成分を用いて波形を合成することが可能である。例えば、振幅 A で周期 T の方形波は

$$F_1(t) = \frac{4A}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{2n-1} \sin(2n-1)\omega t \quad (\text{式 3.16})$$

で表される。ただし、 $\omega = \frac{2\pi}{T}$ である。また、振幅 A で周期 T の三角波は

$$F_2(t) = \frac{8A}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^{n+1} \frac{1}{(2n-1)^2} \sin(2n-1)\omega t \quad (\text{式 3.17})$$

である。これらは、低周波数から高周波数までの正弦波を合成した広帯域周波数成分を有する波であることが分かる。つまり、これらの波形を正確に検出するためには、広帯域に亘る電気光学応答が必要である。ただし、三角波は正弦波の係数が 2 乗となっていることから、その係数が 1 乗である方形波と比べて、より収束性が良いため、波形の再現性が高いと考えられる。透過型の光学測定系を用いて、250V、1 kHz の方形波および三角波電気信号を、DAST 結晶により電気光学プロービングすることで検出した。得られたそれぞれの測定波形(平均化回数:16回)を図 3.20、図 3.21 に示す。いずれの結果においても、波形の乱れや歪みなどが見られず、正確に波形を検出することが分かった。

同様に、KTP 結晶においても方形波、三角波信号の波形測定を行ったが、波形が著しく乱れており、いずれも検出できなかった。ただし、本測定系では、PD の周波数帯域から高速信号の実験ができなため、KTP の感度低下が生じる低周波数(1 kHz)における測定であったことも、不利な要因として挙げられる。

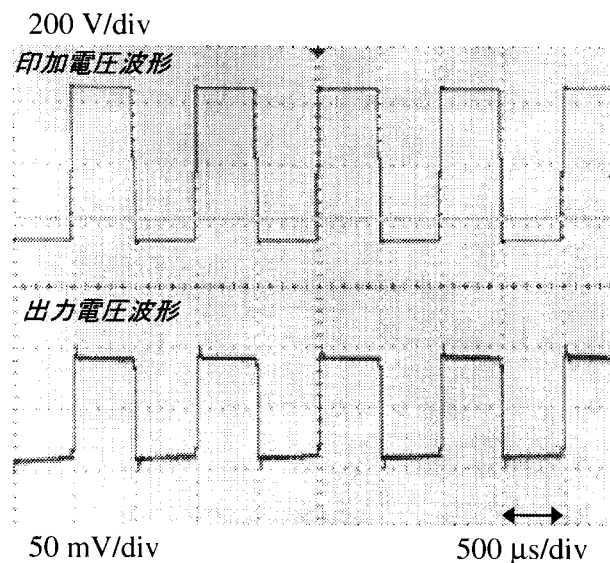


図 3.20 印加電圧波形と DAST 結晶から得られた電気光学信号波形 (方形波)

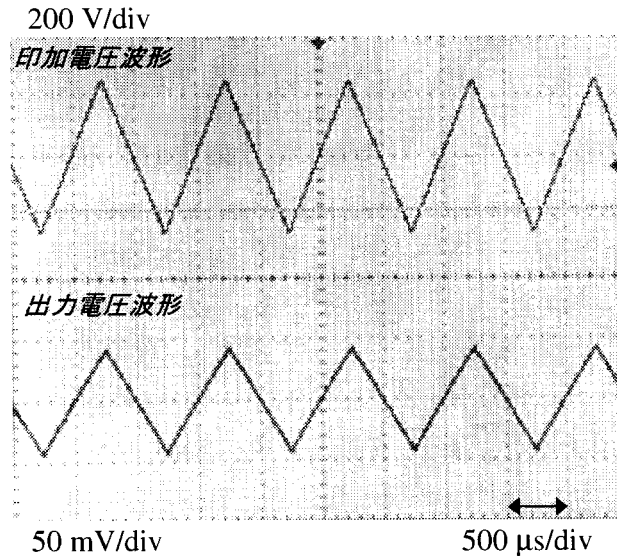


図 3.21 印加電圧波形と DAST 結晶から得られた電気光学信号波形（三角波）

これらの実験結果は、DAST が低周波数から高周波数までの広帯域周波数に亘り、電界を検出できることを実証し、DAST の優れた電気光学特性を明らかにするものである。さらに、DAST の高感度性を考慮すると、DAST 結晶を用いることで、従来の電気光学結晶が有する電界検出特性を凌駕する超高性能電界センサーを実現できると考えられる。今後は、その実用化を目指すとともに、光変調器や光スイッチ、テラヘルツ電磁波発生・検出などへの応用についても検討を行う予定である。

3.6 まとめ

本章では、有機非線形光学結晶 DAST の電気光学素子への応用として電界センサーに着目し、電気光学プロービングによる DAST 結晶の電気光学特性評価について述べた。得られた知見を以下に要約する。

- DAST 結晶を電界センサーとして使用する場合、最大の電気光学定数 r_{11} を使用するには x 軸方向（ほぼ a 軸方向）に電界を印加することと、平板状の結晶形状を考慮すると z 軸方向からレーザー光を入射させるのが得策である。この条件における DAST の電気光学性能は、屈折率を n とすると、 $|r_{11}n_x^3 - r_{21}n_y^3|$ で表されることを示した。
- 波長 $1.55 \mu\text{m}$ の半導体レーザーをプローブ光として、 90 kHz の正弦波信号を電気光学測定したところ、高品質 DAST 結晶の電気光学感度は、横型材料の中で最も優れた電気光学特性を有する KTP 結晶に比べて約 5 倍であり、これまでの報告例(約 4 倍)を超える感度が得られた。

第3章 DAST の電気光学素子への応用

また、DAST と KTP の最小検出電圧 $V_{\min}$ を算出したところ、それぞれ $3.7 \text{ mV}/\sqrt{\text{Hz}}$ 、 $18.0 \text{ mV}/\sqrt{\text{Hz}}$ であることが分かった。

- 電気光学感度の周波数特性を評価し、低周波数領域（30 Hz～90 kHz）における DAST の優れた電気光学特性を初めて明らかにした。DAST は測定したすべての周波数において、感度がほとんど一定（-2 dB）であったのに対し、KTP は周波数が低くなるにつれて、電気光学感度が急激に低下し（-39 dB @ 180 Hz）、180 Hz 以下の信号に対しては感度が得られなかった。この感度低下は、KTP の抵抗率が低いことと、カリウムイオンによる伝導性が誘電率を高くすることで引き起こされたと指摘した。
- DAST を用いた高速電気信号（100 GHz 以上の周波数成分を含む）の高感度電気光学サンプリングに成功した。これは KTP で検出できなかった微弱な電界を測定した結果であり、DAST の高感度性を実証した。DAST の超高感度電界センサーへの応用が可能であることを明らかにしたは、今回が初めてである。
- 高品質 DAST 結晶は、同一結晶内での電気光学感度ばらつきが生じず、得られた感度は測定位置に依らず一定であった。また、透過レーザー光の空間強度分布を調べたところ、DAST 結晶によるレーザー光の散乱やビームプロファイルの変化は観測されず、市販 KTP 結晶と同程度の光学的に優れた DAST 結晶であることが分かった。
- DAST を用いた電気光学測定により、入力電圧信号と同一波形の方形波および三角波電気信号の検出に成功した。方形波および三角波は、広帯域周波数成分を有する信号であることから、DAST が低周波数から高周波数までの広帯域周波数応答特性に優れていることを実証した。KTP 結晶では同じ信号を検出することができなかったことから、DAST はこれまで実現が困難であった超広帯域かつ超高感度電界センサーへの応用が可能であることを、初めて明らかにした。

参考文献

- [1] X.-C. Zhang, X.F. Ma, Y. Jin, T.-M. Lu, E.P. Boden, P.D. Phelps, K.R. Stewart and C.P. Yakymyshyn: Appl. Phys. Lett. **61** (1992) 3080.
- [2] S.R. Marder, J.W. Perry and C.P. Yakymyshyn: Chem. Mater. **6** (1994) 1137.
- [3] Q. Wu and X.-C. Zhang: Appl. Phys. Lett. **67** (1995) 3523.
- [4] Ch. Bosshard, K. Sutter, P. Pretre, J. Hulliger, M. Flörsheimer, P. Kaatz and P. Günter: Organic Nonlinear Optical Materials, Taylor and Francis, London (1995)
- [5] R. Spreiter, Ch. Bosshard, F. Pan and P. Günter: Optics Lett. **22** (1997) 564.
- [6] U. Meier, M. Bösch, Ch. Bosshard, F. Pan and P. Günter: J. Appl. Phys. **83** (1998) 3486.

- [7] 戒能俊邦: 応用物理 **67** (1998) 1125.
- [8] P. Günter: Nonlinear Optical Effects and Materials, Springer Series in Optical Sciences Vol.72, Springer-Verlag, Berlin (1999)
- [9] F. Pan, K. McCallion and M. Chiappetta: Appl. Phys. Lett. **74** (1999) 492.
- [10] K. Kawase, M. Mizuno, S. Sohma, H. Takahashi, T. Taniuchi, Y. Urata, S. Wada, H. Tashio and H. Ito: Optics Lett. **24** (1999) 1065.
- [11] S. Sohma, H. Takahashi, T. Taniuchi and H. Ito: Chem. Phys. **245** (1999) 359.
- [12] U. Meier, M. Bösch, C. Bosshard and P. Günter: Synthetic Metals **109** (2000) 19.
- [13] T. Taniuchi, J. Shikata and H. Ito: Electron. Lett. **36** (2000) 1414.
- [14] P.Y. Han, M. Tani, F. Pan and X.-C. Zhang: Optics Lett. **25** (2000) 675.
- [15] P. Han, M. Tani, F. Pan and X.-C. Zhang: Nonlinear Optics **25** (2000) 123.
- [16] K. Takayama, M. Yoshida, H.-H. Deng, K. Komatsu and T. Kaino: Nonlinear Optics **25** (2000) 413.
- [17] B. Cai, T. Hattori, H.H. Deng, K. Komatsu, C. Zawadzki, N. Keil and T. Kaino: Jpn. J. Appl. Phys. **40** (2001) L964.
- [18] K. Komatsu, K. Takayama, B. Cai and T. Kaino: IEICE Trans. Electron. **E85-C** (2002) 1258.
- [19] B. Cai, K. Komatsu and T. Kaino: Opt. Mater. **21** (2002) 525.
- [20] 谷内哲夫, 四方潤一, 伊藤弘昌: レーザー研究 **30** (2002) 365.
- [21] B. Ferguson and X.-C Zhang: Nature Mater. **1** (2002) 26.
- [22] J.W. Perry, S.R. Marder, K.J. Perry and E.T. Sleva: Nonlinear Opt. Proper. Organic Matel. IV **1560** (1991) 302.
- [23] F. Pan, M.S. Wong, C. Bosshard and P. Günter: Advanced Materials **8** (1996) 592.
- [24] T. Nagatsuma, M. Shinagawa, N. Sahri, A. Sasaki, Y. Royter and A. Hirata: IEEE Trans. Microwave Theory and Tech. **49** (2001) 1831.
- [25] 永妻忠夫, 品川満: NTT R&D **50** (2002) 475.
- [26] K.J. Weingarten, M.J.W. Rodwell and D.M. Bloom: IEEE J. Quant. Electron. **QE-24** (1988) 198.
- [27] T. Nagatsuma: IEICE Trans. Electron. **E76-C** (1993) 55.
- [28] M. Shinagawa, T. Nagatsuma, K. Ohno and Y. Jin: IEEE Trans. Instrum. Meas. **50** (2001) 1076.
- [29] F. Pan, G. Knöpfle, Ch. Bosshard, S. Follonier, R. Spreiter, M.S. Wong and P. Günter: Appl. Phys. Lett. **69** (1996) 13.
- [30] S. Miyazawa and T. Tabata: NTT REVIEW **10** (1998) 62.
- [31] G. Knöpfle, R. Schlessler, R. Ducret and P. Günter: Nonlinear Opt. **9** (1995) 143.
- [32] M. Thakur, J. Xu, A. Bhowmik and L. Zhou: Appl. Phys. Lett. **74** (1999) 635.
- [33] J.D. Bierlein and C.B. Arweiler: Appl. Phys. Lett. **49** (1986) 917.
- [34] 高橋義典: 大阪大学大学院工学研究科, 修士論文 (2000)
- [35] 永妻忠夫, 滝沢孝充, 横尾篤, 戒能俊邦: 1996年電子情報通信学会エレクトロニクスソサイエティ大会 C-221 (1996)
- [36] Y. Mori, Y. Takahashi, T. Iwai, M. Yoshimura, Y.K. Yap and T. Sasaki: Jpn. J. Appl. Phys. **39** (2000) L1006.

第 3 章 DAST の電気光学素子への応用

- [37] K. Kato: IEEE J. Quant. Electron. **27** (1991) 1137.
- [38] T. Nagatsuma, T. Shibata, E. Sano and A. Iwata: J. Appl. Phys. **66** (1989) 4001.
- [39] M.S. Heutmaker, G.T. Harvey and P.F. Bechtold: Appl. Phys. Lett. **59** (1991) 146.
- [40] M. Shinagawa and T. Nagatsuma: IEEE Trans. Instrum. & Meas. **41** (1992) 375.
- [41] 岩村朋, 相原達哉, 藤原隆, 梅垣真祐, 長岡一聡, 安達宏昭, 吉村政志, 森勇介, 佐々木孝友: 第 50 回応用物理学関係連合講演会講演予稿集 No.3 (2003) 予定
- [42] J.D. Bierlein and H. Vanherzeele: J. Opt. Soc. Am. **B6** (1989) 622.
- [43] S. Furusawa, H. Hayashi, Y. Ishibashi, A. Miyamoto and T. Sasaki: Jpn. J. Phys. Soc. **62** (1993) 183.
- [44] H. Ito, T. Furuta, S. Kodama and T. Ishibashi: Electron. Lett. **39** (2000) 1809.
- [45] 柳澤幸樹, 鳥山典之, 青木省一, 太田克志: EO サンプリングプローバ(AY4331)の開発, LSI Testing Symposium (1999)
- [46] S. Manetta, M. Ehrensperger, C. Bosshard and P. Günter: C. R. Physique **3** (2000) 449.
- [47] 安達宏昭: 大阪大学大学院工学研究科, 修士論文 (1998)
- [48] 吉田宗生, 小松京嗣, 小野寺信治, 戒能俊邦: 日本化学会誌 No.9 (2000) 639.
- [49] H. Adachi, T. Higo, K. Nagaoka, F. Tsunesada, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki, Y. Ochiai, H. Yokota and N. Fukasaku: Abst. 2nd Asian Conf. Cryst. Growth & Cryst. Tech. (2002) B-01.

第4章

2 液界面におけるタンパク質結晶の育成

4.1 はじめに

ヒトをはじめとする多くの生物のゲノム塩基配列が決定されたことを受けて、生命に関する研究は大きな変革の時代を迎えている。その流れの中で、バイオインフォマティクス（生命情報工学）などのプロテオームと呼ばれるポストゲノム研究が、盛んになってきており、特に注目されるのが、構造ゲノム科学と呼ばれるタンパク質の3次元構造を解き明かそうとする研究である[1,2]。生体内で実際に様々な動きを司るのは遺伝子ではなく、遺伝子からできるタンパク質であり、タンパク質の構造解析や機能解明は、病気の治療や創薬にも直結するため、タンパク質の詳細な立体構造決定が不可欠だからである。タンパク質は、基本的には20種類のアミノ酸（必須アミノ酸）が一行に繋がって作られているが、この伸びた鎖が3次元空間上に折りたたまれて、生物活性を持つタンパク質となる[3,4]。この際に、配列上では離れて位置する領域が、立体構造上では近接して協同的に働いて、ある生物活性を発現させている。そのため、タンパク質の立体構造を明らかにしてはじめて、そのタンパク質の機能発現メカニズムを解明することができるようになる。

タンパク質の構造解析までの流れを図4.1に示す。3次元構造解析には、現在主にX線構造解析と核磁気共鳴スペクトル(NMR : Nuclear Magnetic Resonance)の2つの方法がある。NMRは溶液状態での解析が可能であるが、決定できるタンパク質の分子量に制限(2~3万程度)があり、その分子量を越えるタンパク質に関しては、X線構造解析が唯一の手段となる[5,6]。X線構造解析では、タンパク質結晶の品質で最終的に得られる結晶構造の精度が決まるため、品質の良い結晶が必要とされる。一方、タンパク質複合体などの巨大分子の構造解析や分解能が1Å近傍を目指した高分解能構造解析、および中性子線構造解析により水素原子や水和構造を決定し生理機能を原子レベルで解明するには、育成が極めて困難な1mm³以上の大型タンパク質結晶が必要である。また、大きな結晶が得られると、SPring-8(兵庫県播磨科学公園都市)などの放射光を利用することなく、実験室系X線装置での立体構造解析が可能となる。

タンパク質結晶は、無機結晶や有機非線形光学結晶DASTなどの低分子性の有機化合物結晶と

第4章 2液界面におけるタンパク質結晶の育成

異なり、分子が巨大で、その構造が複雑なことから、育成が極めて困難である。さらに、結晶が非常に軟らかくて脆いため、壊れやすいなどの取り扱いの問題もある。タンパク質の立体構造解析において、目的とするタンパク質結晶の作製が最も大きな障壁となっており、高品質および大型結晶育成技術の開発が急務である。本研究では、比重差と不溶性を利用して2液界面でタンパク質結晶を浮かべて育成する新しい方法(Two-Liquid System)を提案する。本章では、この方法を用いた高品質および大型タンパク質結晶の育成について述べ、その有効性を明らかにする。

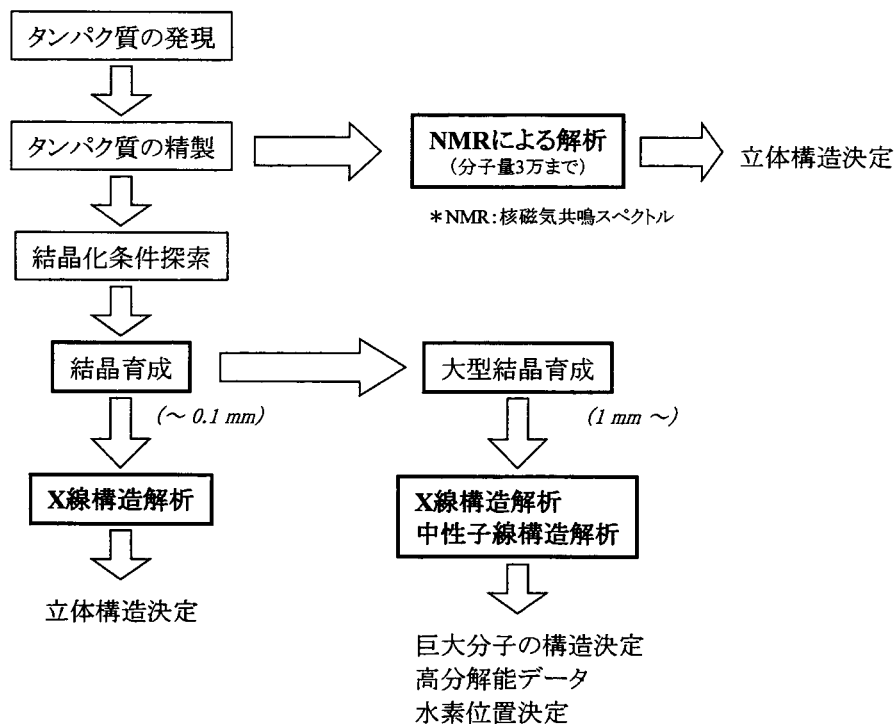


図 4.1 タンパク質の構造解析までの流れ

4.2 タンパク質の結晶育成法

タンパク質の結晶成長メカニズムは、無機や有機低分子化合物を題材として発展してきた結晶成長理論で、基本的に理解できることが分かってきた[7-19]。しかしながら、タンパク質の分子を結晶成長という観点から考えると、低分子化合物とは明らかに異なる次のような特徴が挙げられる。タンパク質には水溶性タンパク質と、生体膜に埋め込まれて機能する膜タンパク質とがあるが、本論文では前者のみを取り扱うことにする。

タンパク質は通常水の中だけで安定に存在でき、水がないと変性してしまう。タンパク質結晶は、水溶液の中でタンパク質分子が規則的に配列した状態であり、その結晶には重量比で 20～90 %の水が含まれている。そのため、タンパク質結晶中では、水分子が結晶構造を維持する上で非常に重要な役割を果たしている。通常、結晶中のタンパク質の周囲には少なくとも 1 層の水分

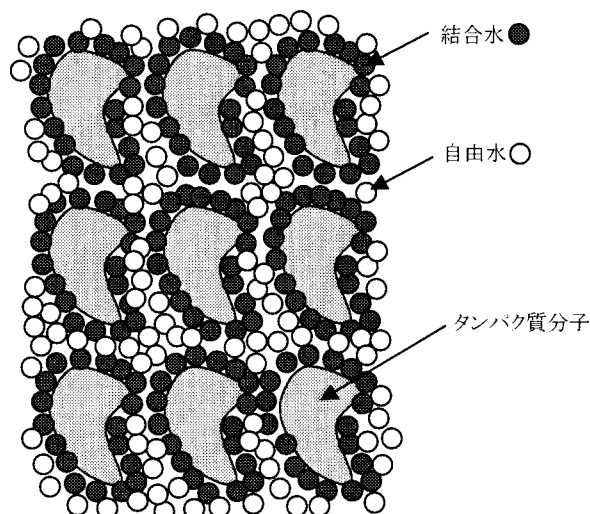


図 4.2 タンパク質結晶中の水分子の様子

子層がかなり緊密にタンパク質分子と結合しており、これら第1層の水分子（結合水）の多くは、タンパク質分子の一部として挙動している。さらに結晶中の分子間の空隙は、結晶内を自由に移動できる自由水で満たされている。結晶中でのタンパク質分子周囲にある水分子の様子を図 4.2 に示す。これらの水分子は構造水と呼ばれ、タンパク質全体の形を安定化させているだけでなく、表面の親水基を決まった構造にするためにも寄与している。

また、タンパク質結晶の大きな特徴として、分子間の相互作用が弱いことが挙げられる。タンパク質のアミノ酸どうしの結合は、共有結合により強くつながっているが、結晶中でタンパク質分子同士を凝集させている相互作用は、水素結合、van der Waals 力、疎水性相互作用、場合によっては静電気力などの弱い力である。さらに、タンパク質は巨大分子であるため、その大きさに対して結合の数が少なく、分子一つあたりの結合力は非常に小さい。従って、タンパク質結晶の機械的強度は極めて小さく、ピンセットなどで取り扱うことができないくらい非常に脆い。例えば、ニワトリ卵白リゾチーム結晶のビッカース硬度は 0.2 kgf/mm^2 と極めて小さい[20]。

これらの特徴を有するタンパク質結晶の育成は、水溶液からの溶液成長で行われる。結晶の析出（結晶化）および成長は、タンパク質溶液を過飽和にすることで実現されるが、得られる試料が少ないなどの種々の制約から、無機や有機の結晶育成法とは異なる独自の結晶育成技術が開発されてきた[21-24]。ここでは、代表的な結晶育成法について説明し、その特徴を明らかにする。その後、本研究で提案する2液界面におけるタンパク質結晶の育成法について述べる。

4.2.1 従来の結晶育成法

これまでに数多くのタンパク質結晶の育成技術が開発されてきた。例えば、Biological Macromolecule Crystallization Database (BMCD) [25]には、生体 2526 種の結晶化に関する 3547 例が

第4章 2液界面におけるタンパク質結晶の育成

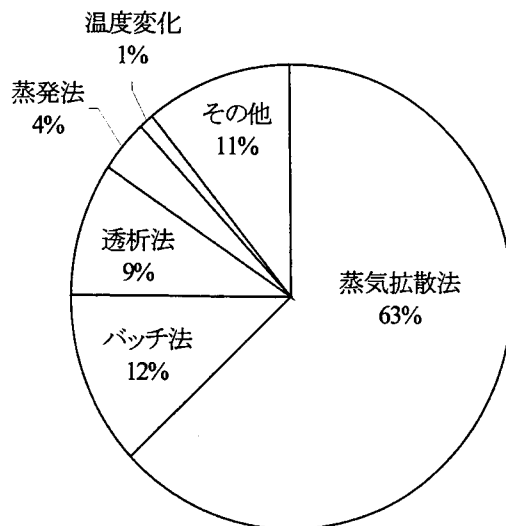


図 4.3 タンパク質の結晶育成法とその結晶化成功例の割合

登録されており、結晶化に成功した手法が 36 種類に分類されている (2002 年 12 月現在)。著者がそのデータを大別し、集計した結果を図 4.3 に示す。この図から、蒸気拡散法の例が圧倒的に多く、バッチ法と透析法によっても多くの結晶化に成功していることが分かる。

蒸気拡散法には、主にハンギングドロップ法とシットティングドロップ法が用いられる。図 4.4 にそれぞれの模式図を示す。リザーバー溶液中には、タンパク質溶液に含まれる沈殿剤 (タンパク質の溶解度を下げる物質) よりも高い濃度の沈殿剤が含まれる。密閉した容器の中で、タンパク質溶液中の水は徐々に蒸発してリザーバー溶液中に拡散し、タンパク質の溶解度に達すると、ゆっくりと結晶化が始まる。ハンギングドロップ法では、撥水処理したガラスに、タンパク質溶液が表面張力でぶら下がった状態にあるので、育成容器との接触面積が少なく、結晶が育成容器に付着することなく成長する。そのため、良質なタンパク質結晶が得られ、結晶の取り出しも容易である。しかしながら、この育成法ではタンパク質溶液の表面張力が、重力に勝っていること

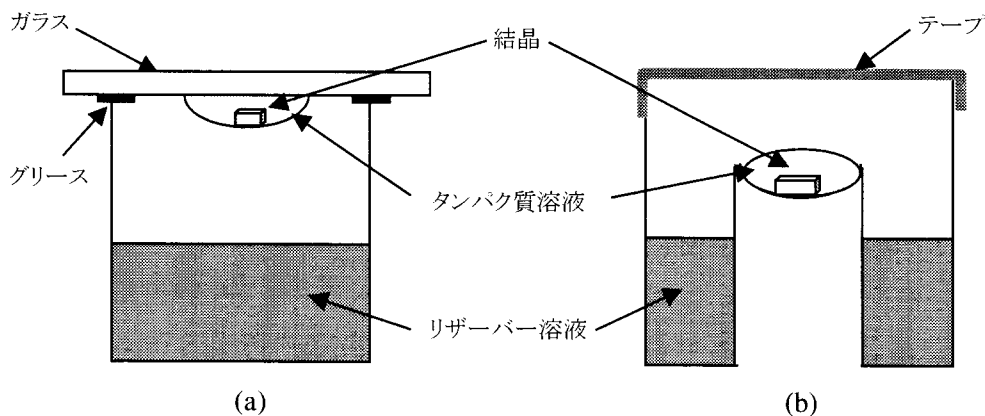


図 4.4 蒸気拡散法によるタンパク質結晶の育成
(a)ハンギングドロップ法と(b)シットティングドロップ法

が条件であるため、その体積は制限される。つまり、期待できる結晶サイズには限界があり、ハンギングドロップ法では、大型タンパク質結晶を得ることができない。

一方、シッティングドロップ法は、タンパク質溶液の体積制限がなく、大きなタンパク質結晶を育成できる。しかしながら、育成容器との接触面積が大きいため、結晶が育成容器に付着すると、結晶品質の低下や取り出しが困難などの問題が生じる。これと同じことが、過飽和溶液を自然静置させて結晶育成するバッチ法にも当てはまる。

透析法は、半透膜を介して低分子の移動を可能とし、高分子の分離や濃縮を行う方法である。図4.5にマイクロ透析法[26]の模式図を示す。一般に、蒸気拡散法に比べて平衡状態に達する時間が短い、最終的に平衡になる状態の pH および塩濃度をあらかじめ設定できる。また、結晶が得られないときに、タンパク質溶液の入ったボタン容器を次の結晶化条件の外液に入れることが可能であり、タンパク質が変性するまで、種々の結晶化条件をテストできることが大きな利点である。欠点として、界面に半透膜があるために、半透膜から多くの核発生が生じ、微結晶が出やすいことが挙げられる。

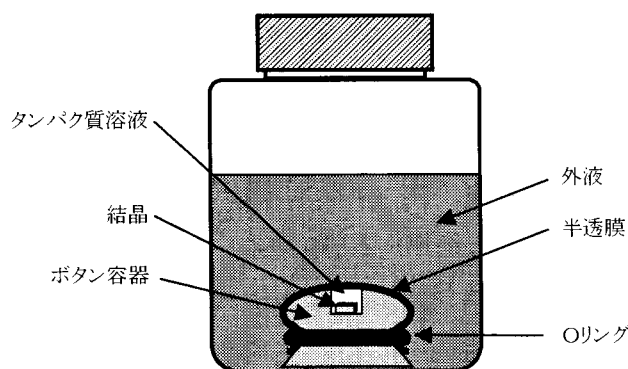


図 4.5 マイクロ透析法によるタンパク質結晶の育成

これまでに開発されたタンパク質の結晶育成法は、それぞれに特長がある。その中で、最も広く用いられている方法は、品質の良い結晶が比較的簡単に得られるハンギングドロップ法である。軟らかく脆いタンパク質結晶が育成容器に付着すると、取出し時に割れや欠け、最悪の場合には崩れてしまうが、この方法では、育成容器に結晶が付着しないようにぶら下がった液滴中で結晶を成長させる。しかしながら、大きなタンパク質結晶が得られないことや育成準備に手間がかかるなどの問題点があることから、簡便に高品質および大型結晶が得られる育成技術の開発が必要不可欠であり、最近、各種育成法の提案がなされている[27-31]。

4.2.2 2液界面における結晶育成法（Two-Liquid System）

タンパク質結晶は非常に軟らかく、壊れやすい。そのため、結晶が容器に付着すると、割れや欠け、クラックなどの機械的な損傷を与えずに、結晶を取り出すことが極めて困難となる。理想

第4章 2液界面におけるタンパク質結晶の育成

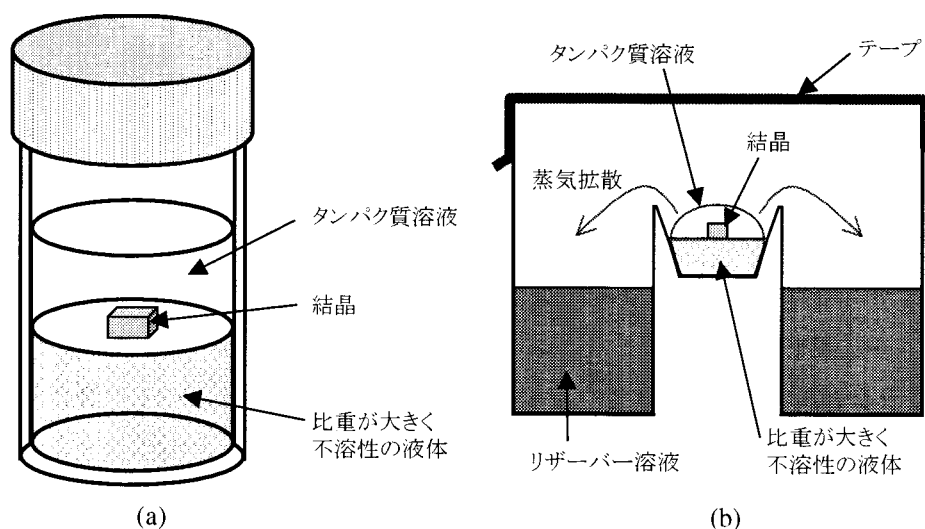


図 4.6 2液界面でのタンパク質結晶育成法 (Two-Liquid System)
(a)2液バッチ法, (b)フローティングドロップ蒸気拡散法

的には、育成容器中に浮かせた状態で結晶を成長させるのが望ましい。そこで、タンパク質溶液よりも比重が大きく、不溶性の液体を用いて、タンパク質結晶を2液界面で浮かべて育成する方法を考案し、Two-Liquid Systemと名づけた。この育成法の模式図を図4.6に示す。これらは、通常用いられるバッチ法やシッティングドロップ蒸気拡散法において、比重が大きく、不溶性の液体をタンパク質溶液に追加するだけで簡単に実現できる。その方法の違いにより、それぞれ2液バッチ法、フローティングドロップ蒸気拡散法と呼ぶ。

本研究では、比重が大きく、不溶性の液体として、フロリナート(商標名、液状高分子フッ化炭素、3M社(米国))を用いた。この液体は密度が 1940 kg/m^3 (FC-70) と大きく、ほとんどの溶媒に対して不溶であるため、タンパク質溶液と完全に分離し、2層に分かれる。フロリナートは無色透明の液体であり、結晶の観察に影響しない。また、熱的、化学的に安定であり、優れた熱伝導性を有することから、温度変化による育成にも適している。この育成法では、フロリナート上にあるタンパク質溶液中で結晶が生じると、結晶は2液界面にとどまり、その状態で成長する。つまり、結晶が容器底面に触れないため、容器に付着しない。そのため、育成終了後は掬い上げる、吸い上げるなどの操作により、軟らかく脆いタンパク質結晶に機械的な損傷を与えることなく、容易に取り出すことが可能である。同様に、種結晶を界面上に導入することも容易である。タンパク質結晶が育成容器に付着して成長すると、結晶の完全性は低下すると報告されている[32]。Two-Liquid Systemでは、タンパク質結晶が下層液体の上に浮かんでいるため、育成容器から応力を受けることがなく、結晶性の低下につながる応力を最小限に抑えることができる。有機非線形光学結晶DASTの育成において、結晶と容器との接触面積を小さくした場合(Slope Nucleation法)、結晶品質が大幅に向上したことから、この育成法においても結晶品質の向上が期待できる。さらに、ハンギングドロップ法とは異なりタンパク質溶液の体積に制限がなく、大型結晶の育成に対

応できる。このように、2液界面における育成は、高品質および大型タンパク質結晶の育成に適した方法であると考えられる。

4.3 温度降下法によるタンパク質結晶の育成

タンパク質の結晶育成において広く使用されているハンギングドロップ法は、蒸気拡散により育成溶液の過飽和度を大きくして、結晶成長の駆動力を得ている。この方法は簡便である反面、過飽和度の厳密な制御が難しく、結晶の成長速度を一定に保つことが困難である。また、結晶育成条件は、実験開始時に固定(決定)され、その後の結晶成長制御ができない。一般に、無機の大型高品質結晶の育成には、過飽和度の精密制御が可能な温度降下法が用いられており、結晶の成長状況に合わせて、リアルタイムでの過飽和度制御が可能である。また、未飽和状態と過飽和状態が可逆であるため、何度でも繰り返し結晶育成ができるという利点も有する。著者は、温度降下法を用いて、育成が難しい有機非線形光学結晶 DAST の高品質化に成功しており、得られた知見や結晶育成装置などが、難結晶育成材料であるタンパク質の結晶育成に活用できると考えた。そこで、この方法を用いて、タンパク質の高品質および大型結晶の育成を行った。

4.3.1 自然核成長による結晶育成

ニワトリ卵白リゾチーム(Hen Egg White Lysozyme)は、市販品を安価で購入できることから、様々な研究領域においてモデルタンパク質として広く利用されている。熱的、化学的に安定であり、結晶化条件や温度に対する溶解度[8,33-36]が既に報告されており、温度降下法による結晶育成が可能である。そのため、ニワトリ卵白リゾチームはタンパク質結晶の育成を開始する材料として最適である。リゾチームは糖を分解する働きを持つ酵素タンパク質で、塩化リゾチームは風邪薬の成分として使用されている抗菌剤である。ニワトリ卵白リゾチームは、初めてX線結晶構造解析がなされた酵素(タンパク質としては2番目)で、129個のアミノ酸残基からなる一本鎖のポリペプチドであり、分子量14 kDaの扁平な球状分子である[37]。

温度降下法による結晶育成は、バッチ法がよく利用される。そのため、従来のバッチ法と、本研究で提案する2液バッチ法(図4.6(a))でニワトリ卵白リゾチームの結晶育成を行い、その有効性を比較検討した。育成装置は、冷却機能を有する低温恒温水槽(アドバンテック東洋製)を用いた。PID制御プログラム機能付き温度コントローラとマグネットポンプによる攪拌により、育成槽内の温度調節精度が $\pm 0.05 \sim \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ であった。熱容量の大きな水を温度調節することにより、外気による温度擾乱を低減し、タンパク質溶液の温度分布ばらつきを最小限に抑えた。

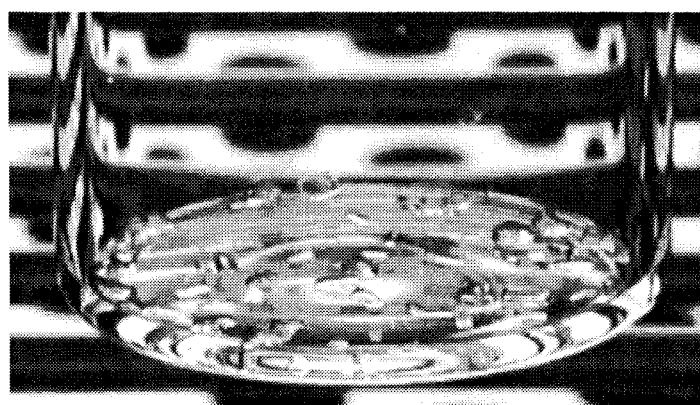
結晶育成溶液は、pH 4.5に調整した0.1M酢酸緩衝溶液の中に、6回再結晶したニワトリ卵白リゾチーム(生化学工業製: Rot E99201) 25 mg/mlと塩化ナトリウム 25 mg/mlを混合したものを使

第4章 2液界面におけるタンパク質結晶の育成

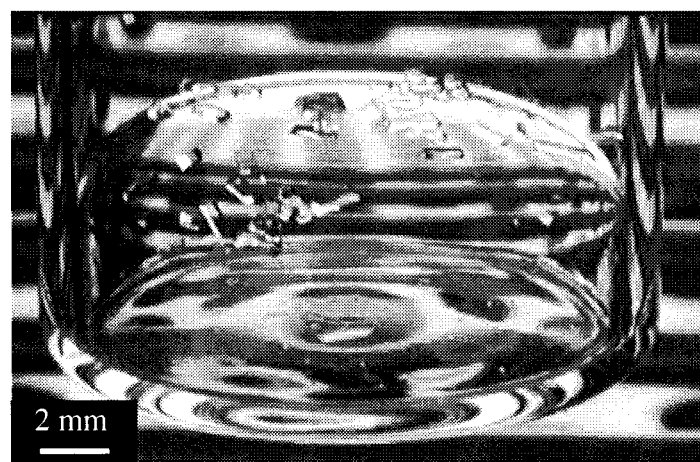
用した。この溶液を 40℃で十分に溶解させた後、25℃まで冷却させ、孔径 0.2 μm のシリンジフィルターにてろ過することにより、不純物を除去した。酸性環境下(pH4.0~7.0)の低温(25℃以下)におけるニワトリ卵白リゾチーム結晶の育成では、正方晶系の結晶が得られやすいことから、この溶液の飽和点は 23.8℃であると考えられる[35]。

結晶育成溶液 2 ml とフロリナート 1 ml が入ったガラス製ネジ付試験管を恒温水槽に入れ、2液バッチ法によるリゾチーム結晶の育成を行った。同時に、結晶育成溶液 2 ml のみのバッチ法による育成も行った。育成開始温度 20℃から、温度降下速度 0.5℃/day で結晶が析出するまで徐冷を行い、結晶の析出を確認した時点で温度を保持し、結晶の急速成長および析出数の増加を抑制した。析出した結晶の成長が確認できなくなった後、温度降下速度 0.1℃/day にて低速育成した。この温度プログラムは、有機非線形光学結晶 DAST の自然核成長による育成において実施した温度プログラムの概念(図 2.20)に基づくものであり、本研究において得られた成果の一つである。

図 4.7 にバッチ法と 2 液バッチ法で得られたニワトリ卵白リゾチーム結晶の写真を示す。バッチ法では容器底面で結晶が成長しているが、2 液バッチ法においては、フロリナート液体上に結



(a)

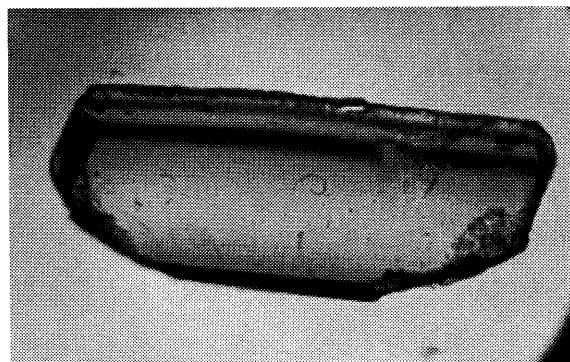


(b)

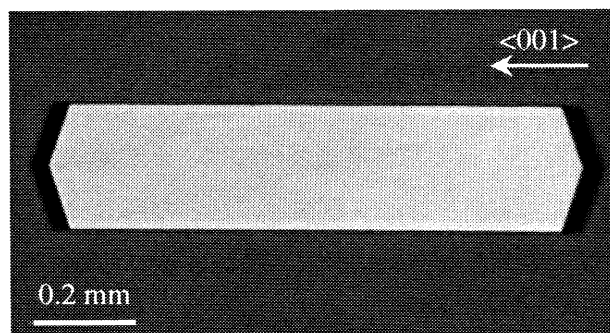
図 4.7 ニワトリ卵白リゾチーム結晶の育成後の様子
(a)バッチ法, (b) 2 液バッチ法

晶が浮かんで成長していることが分かる。結晶析出開始温度はいずれも 13.3℃であり、11 日間の育成を行った。結晶の平均成長速度は約 0.1 mm/day であった。それぞれの育成法において、得られた結晶の形状や大きさを観察したところ、フロリナートの有無による違いは見られなかった。つまり、フロリナートによるタンパク質結晶へのマクロスコピックな影響は、ほとんどないと考えられる。

取り出し後のニワトリ卵白リゾチーム結晶を図 4.8 に示す。容器底面で成長した結晶は、容器に付着していたため、結晶が割れたり崩れたりして、損傷を与えることなく結晶を取り出すことは極めて困難であった。一方、2 液界面で育成した結晶は下層液体の上に浮んでいるため、結晶の取り出しが容易で、クラックなどの機械的な損傷を与えることがなかった。また、得られたニワトリ卵白リゾチームの結晶系は正方晶で、 c 軸方向に細長い形状であった。正方晶の結晶は、育成溶液の過飽和度により結晶形状が変化することが報告されている[7,17]。低過飽和の溶液中では、(110)面の成長速度が (101)面に比べて遅くなり、 c 軸方向に細長い結晶形状になる(図 4.9)。つまり、今回得られた細長い形状の結晶は、低過飽和度下で成長したことを表しており、低速で結晶が成長したと考えられる。一般に、低速で成長した結晶は品質が良く、さらに育成容器に付着することなく 2 液界面で浮遊して成長したことも、結晶の高品質化に寄与すると考えられる。つまり、温度降下法と 2 液界面での結晶育成法を組み合わせることにより、高品質タンパク質結晶



(a)



(b)

図 4.8 取り出し後のニワトリ卵白リゾチーム結晶
(a)底面に付着していたため取り出す過程で崩れた結晶, (b) 2 液界面から取り出した結晶

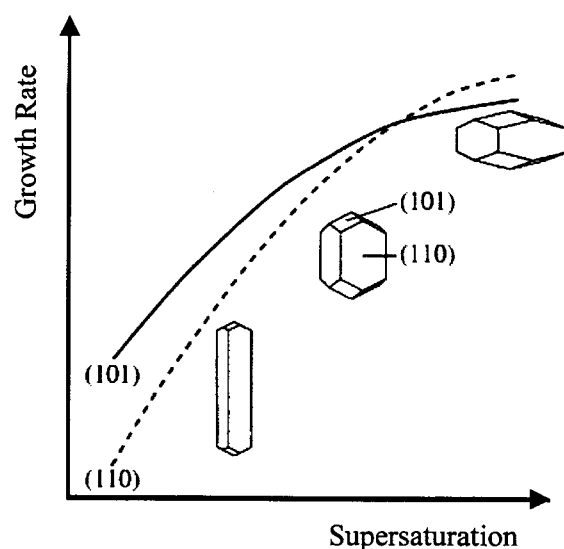


図 4.9 ニワトリ卵白リゾチームにおける過飽和度と結晶面による成長速度の相違[7,17]

を育成するための手法が確立できる可能性を示した。ただし、本研究ではマクロスコピックな観察からの結果であり、ミクロスコピックな結晶品質の評価については、今後の課題である。

温度降下法などの温度変化によるタンパク質の結晶育成報告例[38-41]は、図 4.3 に示したように非常に少ないが、高品質化が求められるタンパク質結晶については、無機や有機結晶と同様、温度変化による精密な成長制御が必要であると考ええる。さらに、タンパク質結晶は非常に軟らかく脆いことから、2液界面における結晶育成法が、非常に有効であることを明示した。

また、タンパク質の試料は希少であることから、溶液量がマイクロリットルオーダーに制限される場合がほとんどである。そこで、ニワトリ卵白リゾチームの 10 μl 以下のタンパク質溶液に対して、温度降下法を用いた 2液バッチ法により結晶育成を行ったところ、ミリリットルオーダーで育成した結果と同様であった。その他、これまでに数種類のタンパク質溶液に対して、温度降下法を用いた 2液バッチ法を試み、その結晶育成が可能であることを確認した。つまり、微量容量のタンパク質溶液に対しても、温度降下法と 2液バッチ法によるタンパク質結晶の育成は、有効であると考えられる。

4.3.2 種結晶による大型結晶の育成

通常の X線回折によるタンパク質の立体構造解析には、自然核成長した結晶の大きさに測定ができる場合が多い。しかしながら、タンパク質複合体などの巨大分子の構造解析や中性子線構造解析においては、1 mm^3 以上の大きなタンパク質結晶が必要である。また、実験室系 X線装置で立体構造解析を行うには、X線強度に制限があるため、望ましくは 0.5 mm^3 程度のタンパク質結晶が求められる。自然核成長による結晶育成は、析出する結晶の数が多いため、得られる結晶は小さい。また、育成中に近接した結晶が互いに付着することで多結晶化する問題が生じる。そのため、大きな結晶を得るには、種結晶を用いることが一般的である。しかしながら、タンパク質

結晶は軟らかく脆いため、機械的な損傷を与えることなく種結晶を導入することが非常に難しい。大型高品質タンパク質結晶を育成するには、良質な種結晶からの成長が不可欠であり、損傷のある種結晶からは、高品質結晶を得ることができない。2液界面における結晶育成では、結晶の取り出し、および種結晶の導入といった結晶の取り扱いが容易であるため、種結晶を用いた大型高品質タンパク質結晶の育成を試みた。種結晶による育成においても、結晶の成長速度を精密に制御できる温度降下法を用い、モデルタンパク質として、ニワトリ卵白リゾチームを選択した。育成溶液条件などは4.3.1節と同じである。

種結晶は2液バッチ法で自然核成長から育成した品質の良い結晶を用いた。種結晶は固定せず、2液界面に浮遊した状態で育成した。育成開始温度は22℃で飽和点23.8℃より低い、種結晶のみがゆっくり成長し、自然核発生しない低過飽和の溶液状態であった。一般に、種結晶の導入は飽和点より数℃上で行う。これは、①種結晶表面を溶かして高品質な部分のみを残して育成を行うこと、②育成初期段階における結晶の急成長を避けることなどの目的がある。しかしながら、①タンパク質結晶の成長には大きな過飽和度（駆動力）が必要であること、②一度結晶化するとなかなか溶けないこと、③平衡状態に達するには1ヶ月以上もかかるなどの特徴から[8]、時間的な損失を考慮し、飽和点より若干低い溶液温度で種結晶を導入した。また、種結晶と溶液との温度差を小さくするため、室温に近い温度で種結晶の導入を行い、結晶育成を開始した。温度降下速度は、種結晶の成長を観察しながら、その速度が一定となるように制御した。

ニワトリ卵白リゾチーム結晶のc軸方向の長さ（mm）と溶液温度（℃）をプロットした育成履歴を図4.10に示す。0.1～0.5℃/dayの温度降下を与え、結晶の成長速度を0.03～0.04mm/dayに制御した。その

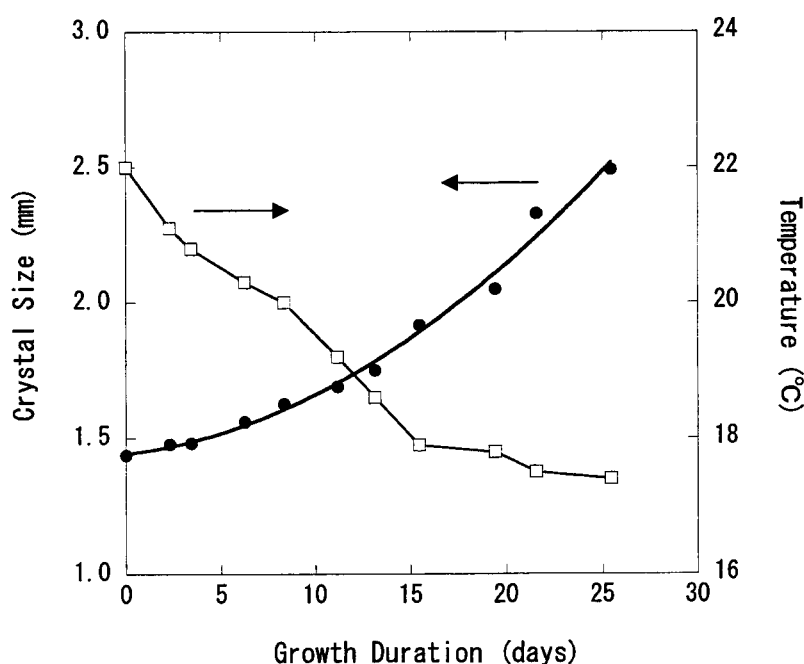


図 4.10 種結晶による大型ニワトリ卵白リゾチーム結晶の育成履歴
●結晶サイズ, ◇溶液温度

第4章 2液界面におけるタンパク質結晶の育成

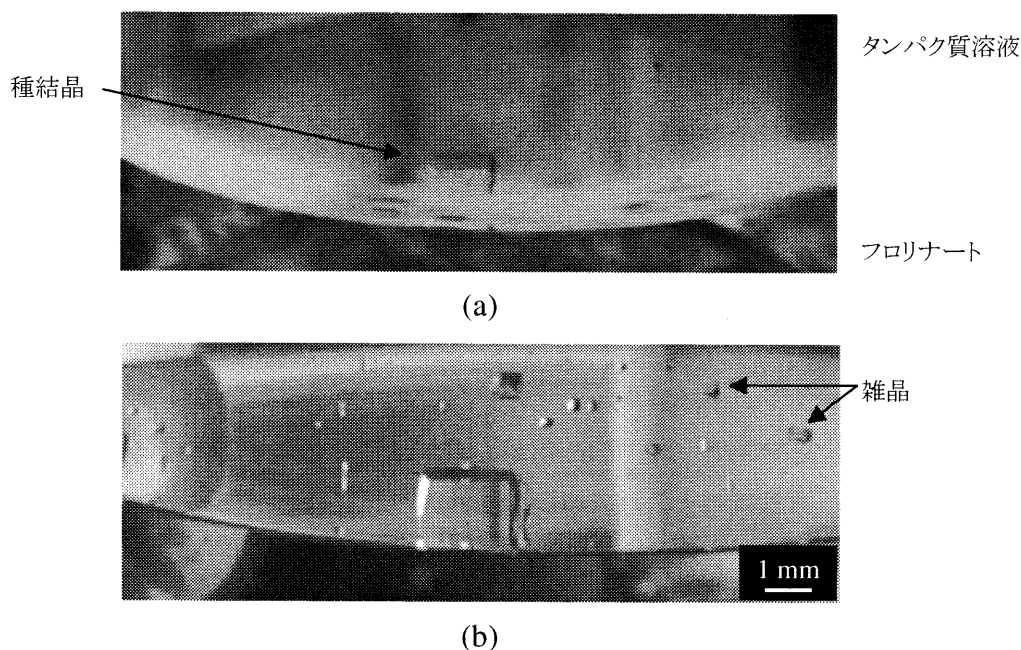


図 4.11 種結晶による大型ニワトリ卵白リゾチーム結晶の写真
(a)育成初期, (b)育成終了時(25 日目)

結果、25 日間の育成で 2.5 mm 長(c 軸方向)の大型ニワトリ卵白リゾチーム結晶が得られた。育成初期と育成終了時のニワトリ卵白リゾチーム結晶を図 4.11 に示す。得られた結晶は c 軸方向に細長い形状をしており、4.3.1 節の自然核成長で得られた結晶と同様に、低過飽和溶液中において低速で成長したことを示唆している。また、種結晶の育成は、自然核成長による結晶育成に比べて 1/2 以下の低速成長が実現できており、結晶性の向上が期待できる。タンパク質における結晶成長は、構造が複雑な巨大分子を 3 次元的に規則正しく配列させる過程であるため、その速度が遅いほど、巨大分子のより均一な配向が期待できる。一般に、自然核成長による結晶は、高過飽和溶液中で析出するため、析出開始直後は結晶の成長速度が速く、次第に低速になっていくと考えられる。それに対して、種結晶は自然核成長が生じない低過飽和溶液中においても成長するため、低速で安定した成長制御が可能であった。つまり、温度降下法と 2 液バッチ法を用いた種結晶の育成により、大型高品質タンパク質結晶の作製が可能であることを実証した。

しかしながら、種結晶による大型タンパク質結晶の育成において、育成初期は種結晶が順調に成長したが、図 4.10 に示したように、育成後期は温度降下速度を小さくしても結晶成長速度が次第に大きくなった。また、育成途中で溶液内に 2 次核（雑晶）が発生する問題も生じた。図 4.11(b)においても、種結晶の周辺に雑晶が析出しているのを確認できる。この実験においては、育成 19 日目に雑晶が発生した。例えば、種結晶の成長速度が 0.05~0.10 mm/day の育成では、10~15 日経過すると雑晶が発生することが多かった。雑晶が発生すると、種結晶の育成が進まず、溶質が無駄に消費され、発生した雑晶成分が種結晶表面に付着して結晶の不均質化や多結晶化、およびインクルージョンが入ったりする。また、雑晶が発生した溶液では、種結晶の成長速度を厳密に

制御するのが困難であり、種結晶があまり成長しないうちに、結晶育成を終了することとなる。

効率よく大きなタンパク質結晶を育成するには、雑晶の発生を極力抑制する必要がある。雑晶発生の原因として、溶液内の濃度不均一が考えられ、次章で述べる溶液攪拌によるタンパク質結晶の育成に取り組むきっかけとなった。

4.4 蒸気拡散法によるタンパク質結晶の育成

前節において温度降下法によるタンパク質の結晶育成を提案したが、この方法は、①精密に温度制御が可能な育成装置を用いること、②温度に対して溶解度があまり変化しないタンパク質には利用できないなどの欠点を有する。そのため、タンパク質の結晶育成において、最も広く用いられる方法は、蒸気拡散法である。本研究で提案した Two-Liquid System においては、フローティングドロップ蒸気拡散法 (図 4.6(b)) により適応できると考える。本節では、フローティングドロップ法を用いたタンパク質結晶の育成を実証するとともに、従来のハンギングドロップ法やシッピングドロップ法と比較することにより、本育成法の特長を明らかにする。

ここでは、ニワトリ卵白リゾチームより結晶育成が難しいタンパク質についての実験結果について述べる。結晶育成に用いた材料は、グルコースイソメラーゼ(Glucose isomerase : 173 kDa, 4 量体)、キシナラーゼ(Xylanase : 210 kDa)、ヒトリゾチーム A32S 変異体(A32S mutant human lysozyme : 15 kDa)の 3 種類を用いた。グルコースイソメラーゼは、ブドウ糖をより甘味度の高い果糖に変換する能力を持つ微生物由来の酵素である。キシナラーゼはキシラン (陸上植物の細胞壁中に多く含まれる多糖) の β -1,4 結合を加水分解する酵素であり、食品、医薬品などの産業において用いられている。ヒトリゾチーム A32S 変異体は、水素結合による構造安定性を調べる目的で、ヒトから得られるリゾチームの 32 番目のアラニンがセリンに置換したタンパク質である [42]。それぞれの結晶育成に用いた溶液条件を下記に示す。

【グルコースイソメラーゼ】 [43]

タンパク質濃度 : 10~30 mg/ml

- ① 5~15 % ポリエチレングリコール(PEG) 6000, 0.2 M 硫酸アンモニウム, pH 7
- ② 1.0 M 蟻酸ナトリウム, pH 6

【キシナラーゼ】 [44]

タンパク質濃度 : 約 15 mg/ml

- ③ 0.7 M リン酸ナトリウムカリウム, pH 7

【ヒトリゾチーム A32S 変異体】 [45,46]

タンパク質濃度 : 約 10 mg/ml

- ④ 1.5~3.0 M 塩化ナトリウム, 0.05 M 酢酸ナトリウム, pH 4.5

第4章 2液界面におけるタンパク質結晶の育成

結晶育成容器はシットティングドロップ蒸気拡散法に対応した市販結晶化プレート(Emerald BioStructures(米国)製 CombiClover Crystallization Plate)を用いた(図 4.12)。このプレートは、中央にリザーバー溶液を入れるための大きな穴があり、その周りに4個のタンパク質溶液を入れる小さな穴があり、蒸気の拡散される気道によって、互いにつながっている。図 4.13 に示したように、同じリザーバー溶液に対して、シットティングドロップ法とフローティングドロップ法により、同条件下で同時に結晶育成を行った。つまり、タンパク質溶液(2~10 μ l)とリザーバー溶液(300 μ l)は同じである。フローティングドロップ法においては、フロリナート(2~10 μ l)を追加した。テープで育成容器を密閉した後、20℃に設定した恒温槽内に静置して、結晶を育成した。

得られた結晶の写真を図 4.14~図 4.17 に示す。グルコースイソメラーゼは溶液条件により結晶形状が異なり、溶液①は六角形のパルク、溶液②は針状結晶が得られた。③キシナラーゼは平板結晶が重なった多結晶、④ヒトリゾチーム A32S 変異体は柱状結晶が得られた。それぞれの育成法において、得られた結晶の形状はフロリナートの有無により、違いは見られなかった。ただし、

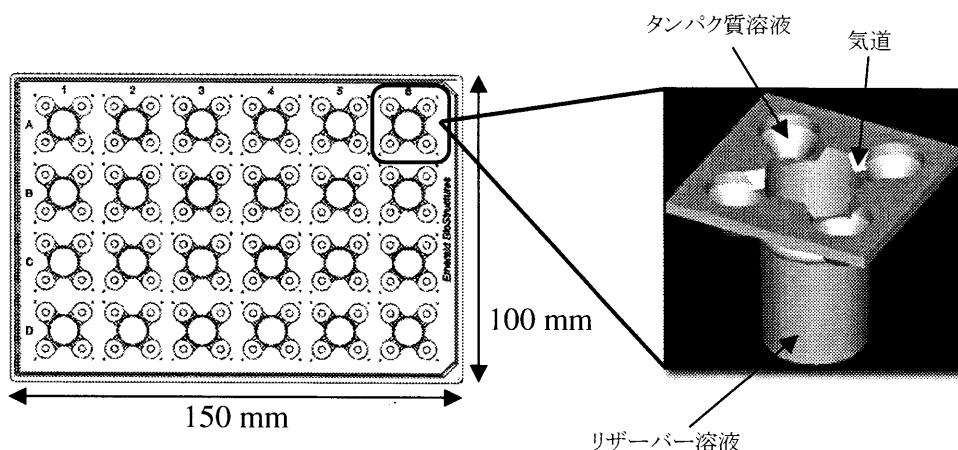


図 4.12 タンパク質結晶育成プレート

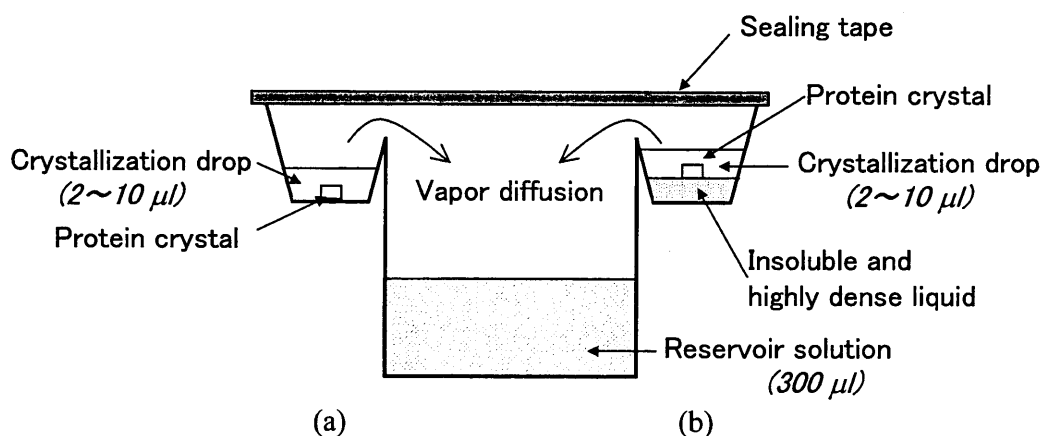


図 4.13 蒸気拡散法によるタンパク質結晶の育成

(a)シットティングドロップと(b)フローティングドロップによる結晶育成

フローティングドロップ法で育成したタンパク質結晶は、下層のフロリナート液体上に浮かんでいたため、取り出しが容易であった。機械的な損傷をもつ結晶はX線回折などによる構造解析が困難となるため、タンパク質結晶に機械的な損傷を与えず、容易に取り出しが可能であることは、最も重要な要素の一つである。本研究では、マクロスコピックな観察からの結果であり、これらの結果から判断すると、フローティングドロップ法は、従来のシッティングドロップ法より優れたタンパク質結晶の育成法であると考えられる。

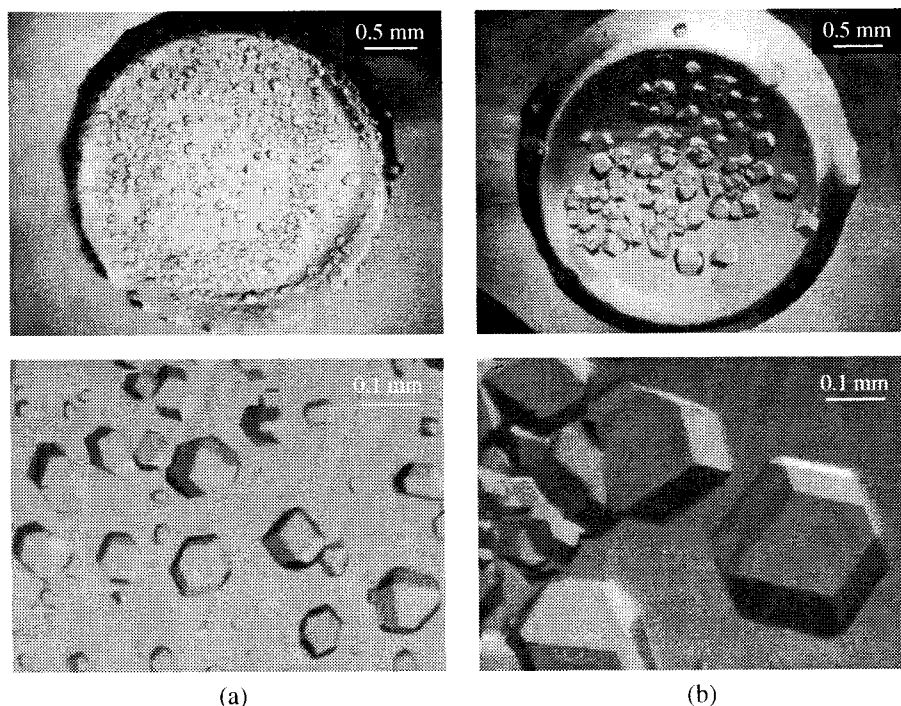


図 4.14 蒸気拡散法にて育成したグルコースイソメラーゼ結晶
①5～15 % PEG 6000, 0.2 M 硫酸アンモニウム, pH 7
(a)シッティングドロップ, (b)フローティングドロップ

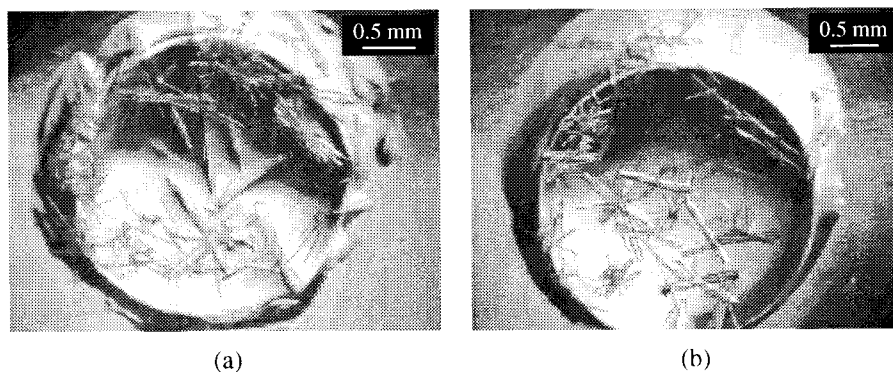


図 4.15 蒸気拡散法にて育成したグルコースイソメラーゼ結晶
②1.0 M 蟻酸ナトリウム, pH 6
(a)シッティングドロップ, (b)フローティングドロップ

第4章 2液界面におけるタンパク質結晶の育成

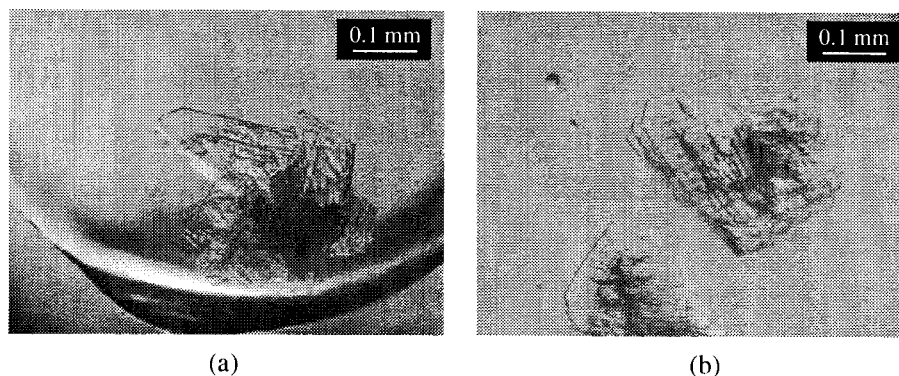


図 4.16 蒸気拡散法にて育成したキシナラーゼ結晶

③0.7 M リン酸ナトリウムカリウム, pH 7

(a)シッティングドロップ, (b)フローティングドロップ

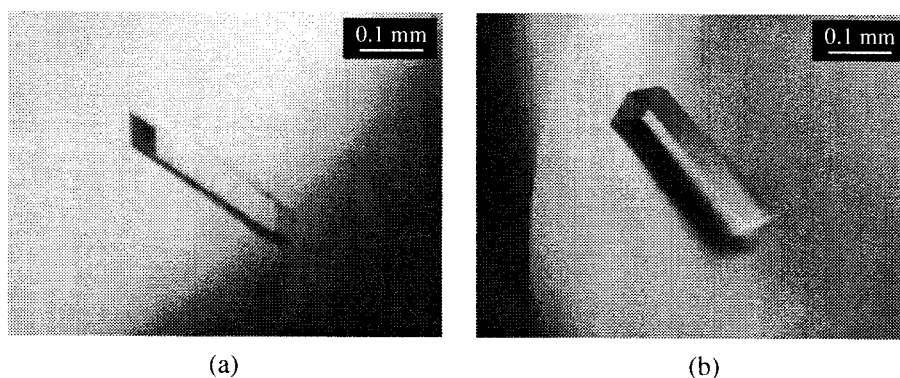


図 4.17 蒸気拡散法にて育成したヒトリゾチム A32S 変異体の結晶

④5～15 % PEG 6000, 0.2 M 硫酸アンモニウム, pH 7

(a)シッティングドロップ, (b)フローティングドロップ

また、図 4.14 や図 4.17 に示したように、フローティングドロップ法で得られたタンパク質結晶の方が、大きい場合があった。著者は、4.3.1 節の 2 液バッチ法と同様、フロリナートによるタンパク質結晶へのマクロスコピックな影響はないと考えているが、成長過程で結晶が容器に付着しない Two-Liquid System においては、結晶の成長が阻害されず、より大きくなった可能性がある。今後、各種タンパク質の結晶育成において、その関係を統計的に調べることで、明らかにしていく予定である。

次に、タンパク質結晶の X 線回折実験について述べる。タンパク質結晶の品質は X 線構造解析の分解能に反映されるため、得られる分解能は結晶品質評価の指標になる。フローティングドロップ蒸気拡散法を用いて、トウモロコシ由来ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) : 約 440 kDa, 4 量体) [47,48]の結晶育成を行った。このタンパク質は、植物の光合成過程において、二酸化炭素を固定（濃縮）して、効率よく光合成を促進させるという生化学的に重要な役割を担っている。その反応機構の解明は、地球温暖化問題

の克服に貢献すると期待されている。しかしながら、良質な結晶が得られず、未だ完全な立体構造が解明されていない。PEPC は、シッティングドロップ法で育成すると、良質な結晶が得られず、回折分解能に優れるデータが取得できなかった。一方、フローティングドロップ法で育成したところ、良質な PEPC 結晶が得られ、実験室系 X 線装置での測定において空間分解能 8 Å のデータが得られた。この結果は、ハンギングドロップ法で得られた PEPC 結晶で取得した分解能と同程度であった。つまり、フローティングドロップ法は、同条件下においてシッティングドロップ法よりも品質の良いタンパク質結晶を育成でき、現在、高品質タンパク質結晶の育成に広く用いられているハンギングドロップ法と同程度の品質を有することが分かった。このことは、下層の液体（フロリナート）がタンパク質結晶の品質に少なくとも大きな悪影響を与えていないことを示している。今後、より詳細な立体構造（空間分解能 1 Å 以下）を得るために、育成条件の最適化を検討（各蒸気拡散法において、最適な育成条件が若干異なると考えている）し、得られたタンパク質結晶を用いて、世界最高性能の放射光を発生することができる SPring-8 での X 線回折実験を行う予定である。

最後に、フローティングドロップ蒸気拡散法と従来の蒸気拡散法であるハンギングドロップおよびシッティングドロップ法との特徴比較を表 4.1 にまとめた。ハンギングドロップおよびシッティングドロップ法は、それぞれ一長一短があるのに対して、本研究で提案したフローティングドロップ法は、両者の利点を合わせ持っており、目立った欠点はない。また、タンパク質の立体構造解析は世界的に激しい競争が繰り広げられており、結晶育成においても高速処理や自動化が求められている[49-54]。フローティングドロップ法はこれらの特長も有しており、タンパク質結晶の育成に有効な手法であると考えられる。

表 4.1 各蒸気拡散法の特徴比較

	<i>Hanging Drop</i>	<i>Sitting Drop</i>	<i>Floating Drop</i>
育成準備	×手間がかかる	○簡単	○簡単
結晶の取り扱い	△やや困難	×困難	○容易
結晶品質	○良い	×悪い	○良い
溶液量	×制限あり	○制限なし	○制限なし
結晶サイズ	×小さい	○大きい	○大きい
自動化	×難しい	○容易	○容易

4.5 まとめ

本章では、比重差と不溶性を利用して2液界面でタンパク質結晶を浮かべて育成する方法(Two-Liquid System)を提案し、温度降下法による2液バッチ法と蒸気拡散によるフローティングドロップ法を用いたタンパク質の高品質および大型結晶の育成について述べた。得られた知見を以下に要約する。

- 有機非線形光学結晶 DAST の自然核成長による結晶育成において実施した温度プログラムの概念に基づき、タンパク質結晶を温度降下法により育成したところ、低過飽和度下で低速成長させることが可能となり、マクロスコピックな観察から評価したところ、品質の良い結晶であることを示した。
- Two-Liquid System はタンパク質結晶を2液界面で浮かべて育成するため、①育成容器に付着せず、結晶品質の低下につながる応力を最小限に抑えることができること、②非常に軟らかく脆いタンパク質結晶にクラックなどの機械的な損傷を与えることなく、容易に結晶を取り出すことが可能であることを示した。また、下層液体として使用したフロリナートによるタンパク質結晶へのマクロスコピックな影響がないことを明らかにした。ただし、液体上に浮かぶタンパク質結晶は、ほとんど成長を阻害されないため、より大きな結晶が得られる可能性があることを指摘した。
- 温度降下法と Two-Liquid System (2液バッチ法) を組み合わせることにより、高品質および大型タンパク質結晶を育成するための手法が確立できる可能性を明示した。
- Two-Liquid System は種結晶を容易に導入できるため、種結晶による大型タンパク質結晶の育成を行い、25日間で2.5 mm 長 (*c* 軸方向)のニワトリ卵白リゾチーム結晶を得た。この結晶の成長速度は自然核成長の成長速度より遅い 0.03~0.04 mm/day であり、低速で安定した成長制御が、大型タンパク質結晶の作製を可能にすることを実証した。
- Two-Liquid System の蒸気拡散法への応用であるフローティングドロップ法で得られた結晶の品質は、現在、高品質タンパク質結晶の育成に広く用いられているハンギングドロップ法と同程度であることを示した。また、フローティングドロップ法は、従来のハンギングドロップ法およびシッティングドロップ法の利点を合わせ持つ、優れた特長を有することから、蒸気拡散法の中で、タンパク質結晶の育成に最も適した方法である可能性を示した。

参考文献

- [1] 特集 動き出したポストゲノム研究, 日経サイエンス 2002 年 1 月号, 日経サイエンス社 (2002) 16.
- [2] 特集 プロテオミクス, 日経サイエンス 2002 年 7 月号, 日経サイエンス社 (2002) 24.
- [3] 木原裕著: 生命現象の物理ーバイオサイエンスは一つになった, 海文堂 (1992)
- [4] 左右田健次, 中村聡, 高木博史, 林秀行著: タンパク質ー科学と工学, 講談社サイエンティフィク (1999)
- [5] 平山令明著: 生命科学のための結晶解析入門, 丸善 (1996)
- [6] 大場茂, 矢野重信編著: X 線構造解析, 朝倉書店 (1999)
- [7] S.D. Durbin and G. Feher: *J. Cryst. Growth* **76** (1986) 583.
- [8] M. Ataka and M. Asai: *J. Cryst. Growth* **90** (1988) 86.
- [9] T. Azuma, K. Tsukamoto and I. Sunagawa, *J. Cryst. Growth* **98** (1989) 371.
- [10] S.D. Durbin and G. Feher: *J. Mol. Biol.* **212** (1990) 763.
- [11] S.D. Durbin and W.E. Carlson: *J. Cryst. Growth* **122** (1992) 71.
- [12] P.G. Vekilov, M. Ataka and T. Katsura: *J. Cryst. Growth* **130** (1993) 317.
- [13] M. Ataka: *Prog. Cryst. Growth & Charact.* **30** (1995) 109.
- [14] A. Nadarajah and M.L. Pusey: *Acta Cryst.* **D52** (1996) 983.
- [15] K. Kurihara, S. Miyashita, G. Sazaki, T. Nakada, Y. Suzuki and H. Komatsu: *J. Cryst. Growth* **166** (1996) 904.
- [16] F. Rosenberger, P.G. Vekilov, M. Muschol and B.R. Thomas: *J. Cryst. Growth* **168** (1996) 1.
- [17] R.F.P. Grimbergen, E.S. Boek, H. Meekes and P. Bennema: *J. Cryst. Growth* **207** (1999) 112.
- [18] L. Rong, T. Yamane and N. Niimura: *J. Cryst. Growth* **217** (2000) 161.
- [19] 佐崎元, 佐藤孝雄, 松浦良樹, 中嶋一雄: まてりあ **41** (2002) 481.
- [20] M. Tachibana, Y. Kobayashi, T. Shimazu, M. Ataka and K. Kojima: *J. Cryst. Growth* **198/199** (1999) 661.
- [21] A. McPherson: *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1999)
- [22] T. Bergfors: *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips*, International University Line, California (1999)
- [23] T.M. Bergfors: *Protein Crystallization*, International University Line, California (1999)
- [24] 平山令明編著: 有機結晶作製ハンドブック, 丸善 (2000)
- [25] <http://wwwbmc.d.nist.gov:8080/bmcd/bmcd.html>
- [26] I. Rayment: *J. Appl. Cryst.* **14** (1981) 153.
- [27] N.E. Chanyen: *Protein Eng.* **9** (1996) 927.
- [28] P.A. Bancel, V.B. Cajipe, F. Rodier and J. Witz: *J. Cryst. Growth* **191** (1998) 537.
- [29] N.E. Chanyen: *J. Cryst. Growth* **196** (1999) 434.
- [30] A. Sanjoh and T. Tsukihara: *J. Cryst. Growth* **196** (1999) 691.
- [31] N.E. Chanyen: *J. Cryst. Growth* **198/199** (1999) 649.
- [32] Y. Higuchi, T. Okamoto and N. Yasuoka: *J. Cryst. Growth* **168** (1996) 99.
- [33] S.B. Howard, P.J. Twigg, J.K. Baird and E.J. Meehan: *J. Cryst. Growth* **90** (1988) 94.

第4章 2 液界面におけるタンパク質結晶の育成

- [34] E. Cacioppo and M.L. Pusey: *J. Cryst. Growth* **114** (1991) 286.
- [35] G. Sazaki, K. Kurihara, T. Nakada, S. Miyashita and H. Komatsu: *J. Cryst. Growth* **169** (1996) 355.
- [36] R.J. Gray, W.B. Hou, A.B. Kudryavtsev and L.J. DeLucas: *J. Cryst. Growth* **232** (2001) 10.
- [37] G. Alderton and H.L. Fevold: *J. Biol. Chem.* **164** (1946) 19.
- [38] R.C. DeMattei and R.S. Feigelson: *J. Cryst. Growth* **122** (1992) 21.
- [39] C.A. Schall, J.S. Riley, E. Li, E. Arnold and J.M. Wiencek: *J. Cryst. Growth* **165** (1996) 299.
- [40] P.A. Darcy and J.M. Wiencek: *J. Cryst. Growth* **196** (1999) 243.
- [41] W.F. Jones, J.M. Wiencek and P.A. Darcy: *J. Cryst. Growth* **232** (2001) 221.
- [42] K. Takano, Y. Yamagata and K. Yutani: *Biochemistry* **40** (2001) 4853.
- [43] H.L. Carrell, J.P. Glusker, V. Burger, F. Manfre, D. Tritsch and J.F. Biellmann: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86** (1989) 4440.
- [44] A. Torronen, J. Rouvinen, M. Ahlgren, A. Harkki and K. Visuri: *J. Mol. Biol.* **233** (1993) 313.
- [45] K. Takano, K. Ogasahara, H. Kaneda, Y. Yamagata, S. Fujii, E. Kanaya, M. Kikuchi, M. Oobatake and K. Yutani, *J. Mol. Biol.* **254** (1995) 62.
- [46] Y. Yamagata, M. Kubota, Y. Sumikawa, J. Funahashi, K. Takano, S. Fujii and K. Yutani: *Biochemistry* **37** (1998) 9355.
- [47] H. Matsumura, T. Nagata, M. Terada, S. Shirakata, T. Inoue, T. Yoshinaga, Y. Ueno, K. Izui and Y. Kai: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55** (1999) 1937.
- [48] H. Matsumura, Y. Xie, S. Shirakata, T. Inoue, T. Yoshinaga, Y. Ueno, K. Izui and Y. Kai: *Structure* **10** (2002) 1721.
- [49] R. C Stevens: *Curr. Opin. Struct. Bio.* **10** (2000) 558.
- [50] U. Heinemann, J. Frevert, K.-P. Hofmann, G. Illing, C. Maurer, H. Oschkinat and W. Saenger: *Prog. Biophys. & Molec. Bio.* **73** (2000) 347.
- [51] J.R. Luft, J. Wolfley, I. Jurisica, J. Glasgow, S. Fortier and G.T. DeTitta: *J. Cryst. Growth* **232** (2001) 591.
- [52] N.E. Chayen and R. Hilgenfeld: *Trends Biotech.* **20** (2002) 320.
- [53] B.D. Santarsiero, D.T. Yegian, C.C. Lee, G. Spraggon, J. Gu, D. Scheibe, D.C. Uber, E.W. Cornell, R.A. Nordmeyer, W.F. Kolbe, J. Jin, A.L. Jones, J.M. Jaklevic, P.G. Schultz and R.C. Stevens: *J. Appl. Cryst.* **35** (2002) 278.
- [54] 安武義晃, 姚閔, 渡辺信久, 田中勲: *生化学* **74** (2002) 1272.

第5章

溶液攪拌によるタンパク質結晶の育成

5.1 はじめに

結晶成長を制御するためには、育成溶液の状態を可能な限り均一にすることが望まれる。例えば、種結晶育成における濃度分布は、部分的な高過飽和を生むため、2次核（雑晶）の発生を引き起こしたり、結晶品質の低下につながる要因となる。雑晶が発生すると、その成長に溶質が消費され、種結晶に十分な溶質を供給することができなくなり、種結晶の成長が阻害される。また、雑晶の数や大きさが不確定なため、種結晶の成長速度の制御が困難となる。さらに、種結晶に雑晶が付着して多結晶化する恐れがあるため、長期間の育成ができず、目的の大きさまで成長させることが難しい。効率よく品質の良い大きな結晶を育成するには、溶液濃度を均一に保ち、かつ、雑晶の発生を抑制する必要がある。そのため、一般的には結晶育成中に溶液の攪拌が行われる。攪拌により溶液の濃度や温度を均一化することで、精密な過飽和度の制御が容易となり、高品質および大型結晶の作製が実現されてきた。また、溶液攪拌における流れのダイナミクスや結晶成長メカニズムなどの研究も盛んに行われている[1]。

一方、タンパク質の結晶育成においては、育成中は可能な限り静置させるのが一般的であり、溶液の対流を抑制することで品質の良い結晶が得られるとされてきた。特に、宇宙などの微小重力環境下で対流を抑制し、結晶の高品質化および大型化が検討されてきた[2-13]。つまり、これまでのタンパク質結晶の育成では、溶液攪拌は有害無益とされてきた。しかしながら、前章で述べた種結晶を用いた大型タンパク質結晶の育成において、一定の成長速度を長期間保つことが難しく、さらに多くの雑晶が発生したことから、無機や有機などの結晶育成と同様に、攪拌による溶液状態の制御が必要であると考えた。これは、従来のタンパク質結晶の育成における概念とは異なる新しいアプローチである。溶液攪拌をタンパク質の結晶育成において、積極的に応用するのは、著者の知る限り、今回が初めてである。本章では、タンパク質結晶の育成に適応する新しい溶液攪拌法を提案し、その有効性と溶液攪拌の効果を明らかにする。また、温度降下法と溶液攪拌による大型高品質タンパク質結晶の育成について述べる。その結果、溶液攪拌がタンパク質結晶の育成においても、必要であることを明示する。

5.2 攪拌方法 (FAST)

溶液を攪拌するにあたり、最も重要なことは、①溶液に機械的な衝撃を与えないこと、②全体的に均一な攪拌を行うことなどが挙げられる。溶液への機械的な衝撃は核発生を引き起こし、不均一な攪拌は濃度分布を発生させるためである。さらに、タンパク質の結晶育成においては、結晶が非常に軟らかく脆いため、攪拌による刺激や対流により結晶が崩れたり、変性したりするなどの弊害が生じる恐れがある。そのため、静置や対流を抑制する試みが積極的になったと考えられる。従って、タンパク質の結晶育成においては、機械的な衝撃を極力抑えた攪拌が必要である。つまり、緩やかに溶液を攪拌しなければならないが、実際には難しい。

タンパク質結晶を2液界面で浮かべて育成する Two-Liquid System の有効性は、前章で明らかにした。この優れた育成法を発展させ、溶液攪拌を行う新しい手法を考案し、Floating And Stirring Technique (FAST)と名づけた。この手法の模式図を図 5.1 に示す。下層の液体に入れた回転子を磁気スターラーにより回転させ、下層の液体を攪拌することにより、上層のタンパク質溶液を間接的に攪拌する。磁気スターラーは小型で簡便なことから、溶液を攪拌する場合に広く利用されている。また、回転子が直接溶液を攪拌するため、攪拌能力が高く、溶質を溶媒に溶解させるときなどに適する。しかしながら、タンパク質の結晶育成においては、前述したように、緩やかな攪拌が必要であり、スターラーでの直接攪拌は刺激が強すぎる。スターラーは簡便であるが、緩やかな攪拌には適さない。一方、FAST は下層液体が磁気スターラーの駆動力を和らげることで、緩やかな攪拌を実現できる。また、タンパク溶液内に駆動機構（回転子）がなく、界面全体で攪拌を行うため、機械的な刺激や激みが少ない。攪拌強度などの制御は、回転速度、回転子の形状、

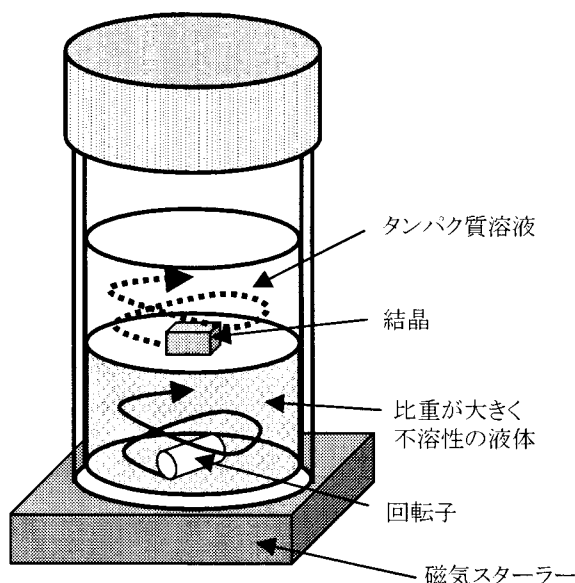


図 5.1 Floating And Stirring Technique (FAST)の模式図

下層液体の容量や粘度を変化させることで、任意に調整できることも、FAST の大きな特長の一つである。本研究の大型タンパク質結晶の育成に使用するテフロン容器（外径 26.5 mm, 20 ml）においては、スターラーの回転速度、回転子形状、フロリナートの容量は、それぞれ 100 rpm、10 mm 長×φ4 mm、10 ml のとき、適度な攪拌となることが溶液攪拌実験にて分かった。当然のことであるが、FAST は Two-Liquid System の特長をすべて有する。

5.3 溶液攪拌の効果

溶液攪拌の効果を調べるために、温度降下法を用いた自然核成長による結晶育成において、攪拌の有無による結晶成長の違いを調べた。モデルタンパク質として、前章で用いたニワトリ卵白リゾチーム（溶液条件：タンパク質濃度 25 mg/ml, 0.1M 酢酸ナトリウム, 2.5% 塩化ナトリウム, pH 4.5）を使用した。実験条件は下記の 4 通りである。

- (a) スターラーによる直接攪拌：タンパク質溶液 8 ml, 回転速度 100 rpm
- (b) バッチ法による育成（従来法）：タンパク質溶液 8 ml
- (c) 2 液バッチ法による育成：タンパク質溶液 8 ml, フロリナート 10 ml
- (d) FAST による育成：タンパク質溶液 8 ml, フロリナート 10 ml, 回転速度 100 rpm

ただし、ネジ蓋付テフロン容器（外径 26.5 mm, 20 ml）を育成容器とし、10 mm 長×φ4 mm の回転子を用いた。これら 4 本の育成容器を恒温水槽に入れ、同時に結晶育成を行い、その様子を観察した。育成開始温度 17℃から、0.5℃/day の温度降下速度にて溶液温度を降下させたところ、14.2℃で結晶の析出を確認し、14.1℃で 7 日間溶液温度を保持し、結晶育成を行った。

結晶育成の結果を図 5.2 に示す。スターラーで直接攪拌した溶液は、タンパク質が変性してしまい、溶液が白濁化した。スターラーでの直接攪拌は、機械的な刺激が強すぎるため、タンパク質結晶の育成には適していないことが明らかである。通常、スターラーの回転速度を制御できるが、非常に低速な回転では、回転子が停止するケースが多く、継続的に安定した溶液攪拌ができない。たとえスターラーによる低速回転が実現できたとしても、駆動部（回転子）がタンパク質溶液の下部にあるため、回転子がタンパク質結晶と衝突し、機械的な損傷を与えてしまう。

一方、溶液攪拌をしなかったバッチ法や 2 液バッチ法の場合、いずれの溶液においても非常に多くの結晶が析出した。そのため、個々の結晶サイズは大きくても 1 mm 程度と小さかった。タンパク質溶液を間接的に攪拌した FAST においては、タンパク質が変性することなく、結晶が析出した。ただし、溶液攪拌しない場合に比べて、結晶の析出数が明らかに少なかった。析出数が減少したことにより、結晶 1 個に対する溶質の供給量が増加し、攪拌をしなかった溶液中で育成した結晶に比べて、結晶サイズが大きくなり、1 mm を超えるものが得られた。結晶形状についても、低過飽和で成長したことを示唆する細長い形状であった（4.3.1 節参照）。さらに、FAST は緩やかな攪拌を実現しているため、育成途中で結晶が崩れるなどの問題は生じなかった。

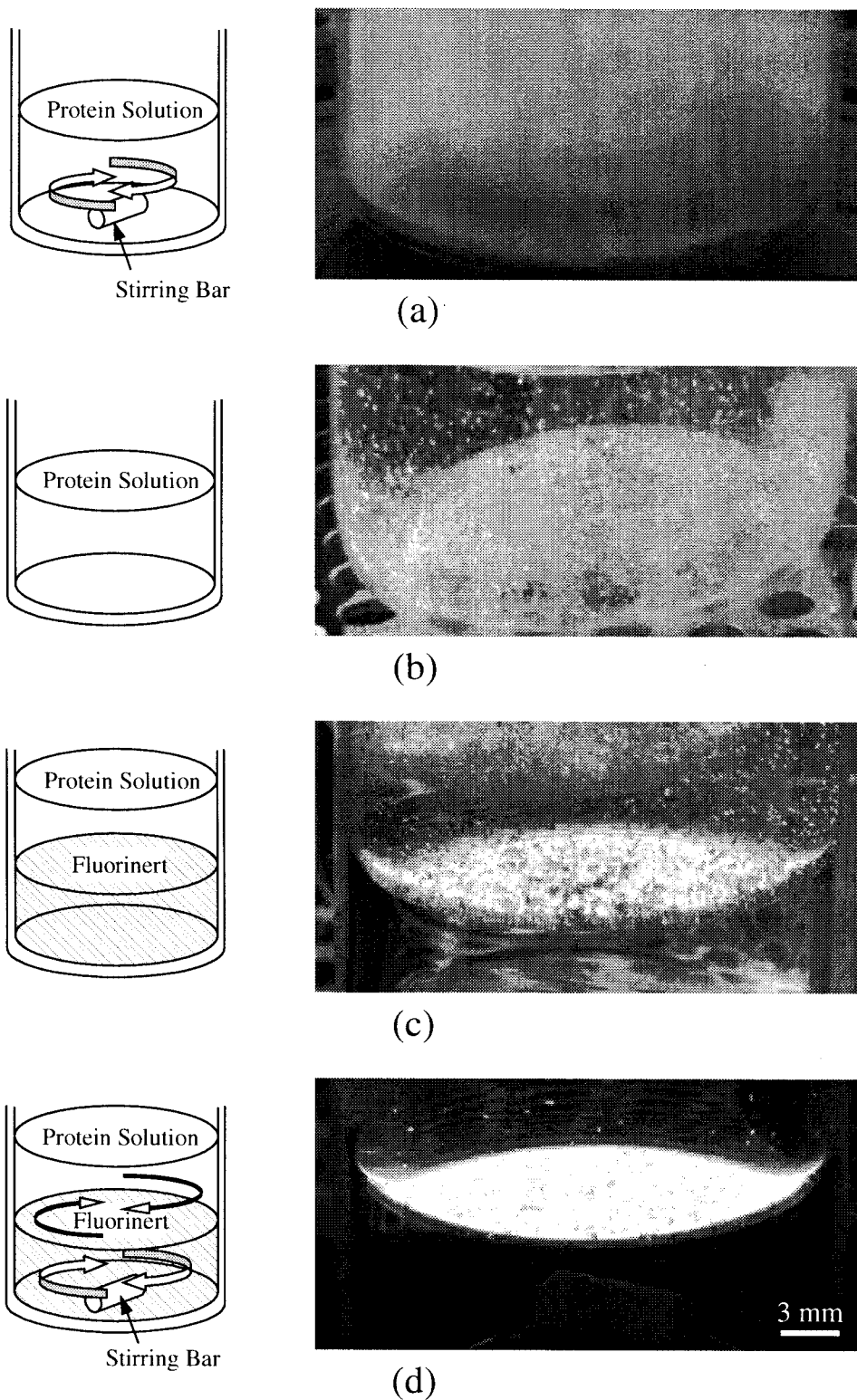


図 5.2 溶液攪拌実験の模式図と自然核成長による結晶育成後の様子

- (a) スターラーによる直接攪拌：タンパク質溶液 8 ml, 回転速度 100 rpm
- (b) バッチ法による育成（従来法）：タンパク質溶液 8 ml
- (c) 2 液バッチ法による育成：タンパク質溶液 8 ml, フロリナート 10 ml
- (d) FAST による育成：タンパク質溶液 8 ml, フロリナート 10 ml, 回転速度 100 rpm

以上の実験結果から、タンパク質結晶の育成において、タンパク質が変性することなく、かつ、結晶に機械的な損傷を与えない程度の緩やかな溶液攪拌が必要であることが分かった。さらに、溶液攪拌により、結晶の析出数が少なくなり、得られる結晶サイズが大きくなることが明らかとなった。ここで最も重要なことは、機械的な刺激を極力抑えた緩やかな攪拌である。例えば、FASTにおいても、上記の実験条件で回転速度を 150 rpm に設定し、溶液攪拌を強くしたところ、タンパク質の変性は起こらないが、核発生を促進させてしまった。結果として、攪拌を行わない場合と同程度の結晶析出数が確認できた。つまり、攪拌し過ぎる（機械的な刺激が強すぎる）と変性や微結晶の析出を引き起こしてしまうが、刺激の少ない適度な攪拌においては、溶液濃度が均一化されることにより、自然核発生数を抑制できたと考えられる。FAST は、液体を介した間接攪拌であることから機械的な刺激が少なく、かつ、攪拌強度を任意に調整できるため、タンパク質結晶の育成に求められる攪拌条件を実現することが可能である。従って、FAST はタンパク質結晶の育成に適応する、優れた攪拌法であると考ええる。

5.4 溶液攪拌による大型タンパク質結晶の育成

4.3.2 節で述べた種結晶からの大型タンパク質結晶の育成において、育成初期は種結晶の成長を精密に制御可能であったが、育成期間が長くなるにつれて、結晶の成長制御が困難となり、最終的には温度降下速度を小さくしても、結晶の成長速度が増加する現象が起こった。また、育成途中で、溶液内に雑晶が発生する問題も生じた。これらの問題点の要因として、溶液内の濃度不均一が考えられるため、本節では FAST による溶液攪拌を行いながら、大型タンパク質結晶の育成を試みた。

タンパク質の未飽和溶液においては、溶液の濃度差が生じないが、過飽和にしたタンパク質溶液では、濃度勾配が発生し、下部に濃い溶液が溜まる傾向がある[14,15]。これは、未飽和溶液においては、分子が単体として溶液内を自由に動き回っているが、溶液が過飽和状態になると分子集団であるクラスターが形成され[16]、これらクラスターが重力により溶液下部に沈降したと考えられる。特に、タンパク質は分子量が非常に大きいため、重力による影響が大きくなる。つまり、地上実験においては、静置したタンパク質の過飽和溶液は時間が経つにつれて、溶液下部にクラスターが集中し、部分的に溶液濃度が高くなると考えられる。これらの現象が、溶液内の濃度分布を生じさせる要因になっていると考ええると、種結晶による大型タンパク質結晶の育成における問題点をうまく説明できる。

静置パッチ法における種結晶育成では、育成時間とともにタンパク質溶液の下部に存在する種結晶の周辺が高過飽和度となり、種結晶の成長が促進される。さらに、種結晶に供給されなかった溶質が、過飽和度が高くなるにつれて、臨界核半径を越えるクラスターを次々に形成し、自然核による結晶の析出、つまり、雑晶の発生が引き起こされたと考えられる。これら一連のメカニ

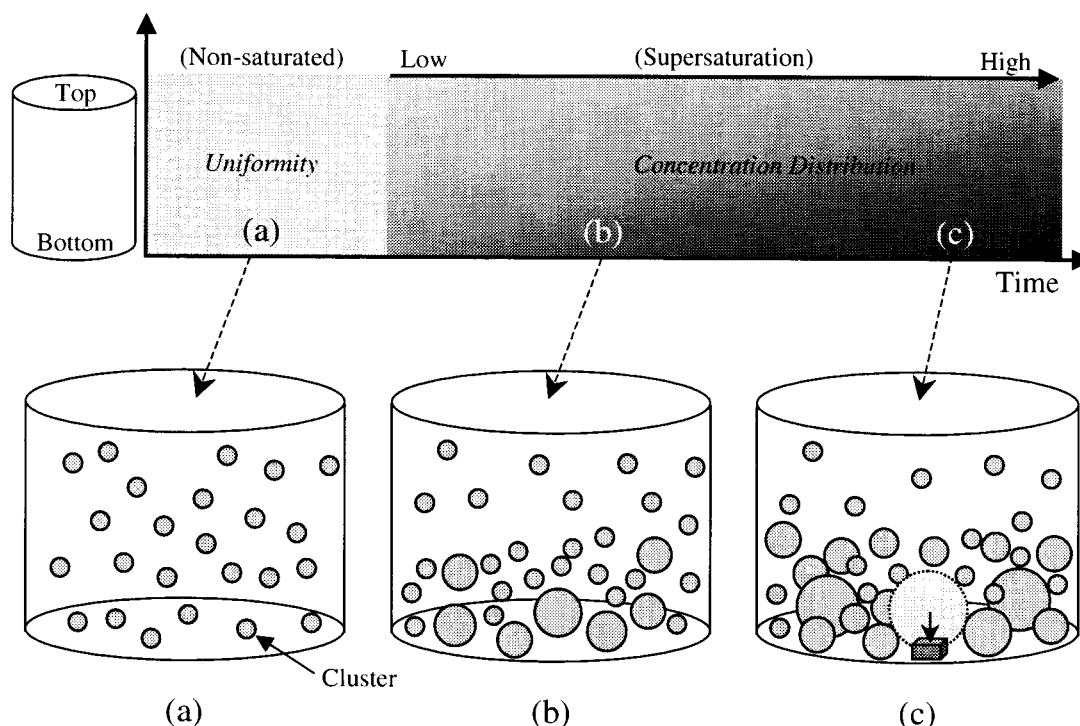


図 5.3 タンパク質溶液内での濃度分布（模式図）

(a) 未飽和溶液および(b), (c)過飽和溶液

(c)では過飽和度が高い場合、自然核発生による結晶の析出が生じる

ズムを図 5.3 に模式的に示した。また、濃度不均一は種結晶の成長にも悪影響を与え、結晶品質の低下につながる。従って、大型高品質タンパク質結晶の育成には、溶液濃度を均一にする必要があり、溶液攪拌が有効であると考えられる。

攪拌をした溶液では、結晶の析出数が少なくなることが、前節の実験結果から明らかとなった。これは、種結晶からの結晶育成において、雑晶の抑制に効果的であると考えられ、溶液攪拌による大型タンパク質結晶の育成を行った。モデルタンパク質はニワトリ卵白リゾチームを選択した。育成溶液条件などは 4.3.1 節と同じである。比較として、溶液攪拌のない 2 液バッチ法による種結晶育成も同時に行った。いずれも種結晶（約 1.5mm）を固定せず、2 液界面に浮遊させた状態で育成した。FAST では、緩やかな攪拌を実現しているため、種結晶が対流により移動することはなかった。

育成開始温度は 22℃で、温度降下速度は種結晶の成長速度が一定となるように調整した。ニワトリ卵白リゾチーム結晶の *c* 軸方向の長さや溶液温度をプロットした育成履歴を図 5.4 に示す。溶液攪拌した結晶育成においては、育成期間 20 日で 3.0 mm 長の大型結晶が得られた(図 5.5)。同じ温度降下で育成したにも関わらず、結晶の成長速度は、攪拌なしの場合が 0.03 mm/day であったのに対して、攪拌ありの場合は 0.07 mm/day と 2 倍以上も速かった。溶液攪拌をすることにより、種結晶への溶質供給が促進され、結晶がより速く成長したと考えられる。また、溶液攪拌を

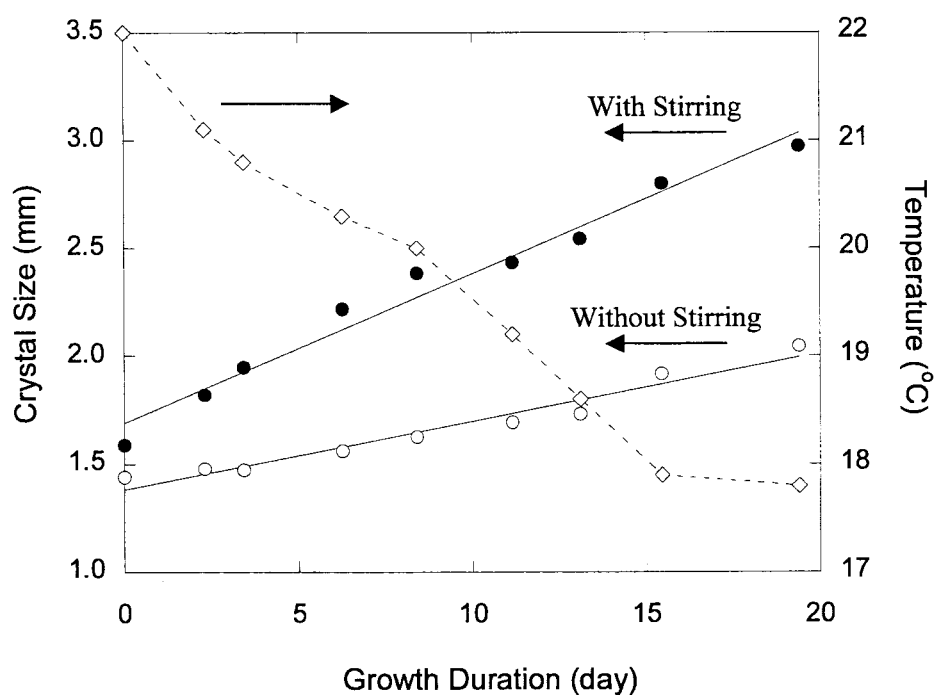


図 5.4 ニワトリ卵白リゾチーム結晶の育成履歴

実線：結晶サイズ（●溶液攪拌あり(FAST), ○溶液攪拌なし(2液バッチ法)）
破線：溶液温度(◇)

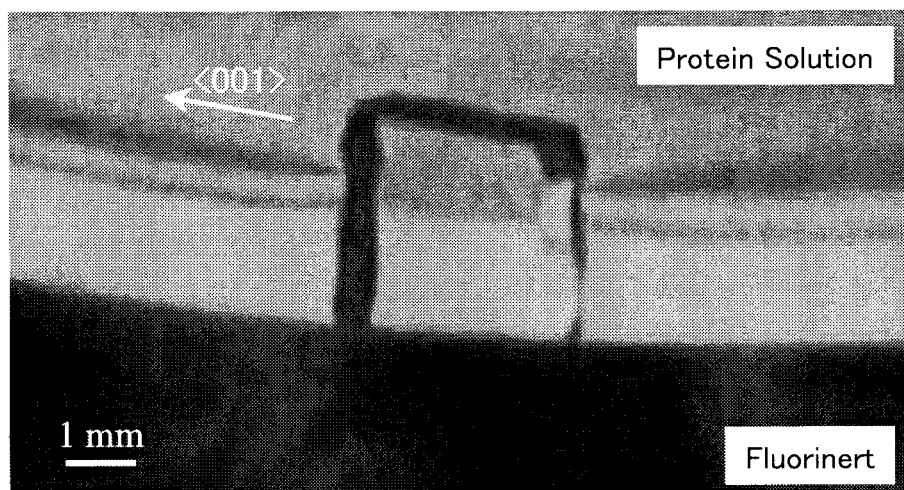


図 5.5 溶液攪拌により育成した大型ニワトリ卵白リゾチーム結晶

しない従来法において、成長速度 0.07 mm/day 程度の高速育成を行うと、20 日未満で雑晶が発生していたが、今回の FAST による結晶育成では、雑晶の発生は見られなかった。これは、溶液攪拌により濃度が均一化された結果であると考えられ、FAST を用いた大型タンパク質結晶の育成では、雑晶の発生を抑制できることが分かった。

第5章 溶液攪拌によるタンパク質結晶の育成

以上のことから、適度な溶液攪拌は大型高品質タンパク質結晶を効率よく育成するために必要であると考えられる。溶液攪拌の効果として、①溶液濃度の均一化、②種結晶への溶質供給、③自然核発生の抑制などが挙げられる[17]。これらの効果が、種結晶の成長制御を可能とし、一定速度での安定成長に寄与したと考えられる。また、同一条件下において、従来法と比べて高速成長や長期間の育成が実現できることを明らかにした。さらに、無機結晶の育成などで報告されてきたように、溶液攪拌による結晶品質の向上も期待できる[18-22]。

本研究では、マクロスコピックな観察から結晶品質を判断してきたが、タンパク質結晶の詳細な品質評価については、その方法を確立することが、この研究分野における大きな課題の一つとなっている。現状では、X線結晶構造解析で得られる立体構造解析データの分解能により判断するのが一般的である。その他、中性子線構造解析[23]やX線トポグラフィーによる結晶内部の欠陥観察[24-26]、原子間力顕微鏡(AFM: Atomic Force Microscope)による結晶表面観察[27-33]などの評価方法も報告されている。今後、溶液攪拌による結晶品質への影響を詳細に調べるとともに、タンパク質結晶の品質評価方法の確立についても検討を行う。また、本手法を他の難結晶育成タンパク質へ応用することにより、その構造および機能解明につながるタンパク質結晶の作製にも取り組む予定である。その際、希少性の高いタンパク質では入手できる育成溶液が制限されるため、微量容量溶液に対しても、溶液攪拌を可能とする新しい方法(Micro-stirring technique)の開発を進める予定でもある。

5.5 まとめ

本章では、従来のタンパク質結晶の育成において、有害無益とされてきた溶液攪拌による結晶育成を提案した。タンパク質結晶の育成に適応する新しい溶液攪拌法(FAST: Floating And Stirring Technique)を考案し、その有効性と大型タンパク質結晶の育成について述べた。タンパク質結晶の育成において、溶液攪拌を積極的に応用したのは、今回が初めてである。得られた知見を以下に要約する。

- Two-Liquid System を発展させた FAST は、液体を介したスターラーによる間接攪拌であることから機械的な刺激が少なく、攪拌強度は、回転速度、回転子の形状、下層液体の容量や粘度を変化させることにより、任意に制御できる。そのため、タンパク質が変性することなく、かつ、結晶に機械的な損傷を与えない程度の緩やかな溶液攪拌を実現できることを明らかにし、FAST がタンパク質結晶の育成に適応する、優れた攪拌法であることを明示した。
- FAST による刺激の少ない適度な溶液攪拌を行うことにより、同条件下で溶液攪拌をしない結晶育成に比べて、自然核成長による結晶の析出数が減少し、得られる結晶サイズが大きくなることを実証した。

- 溶液攪拌による種結晶の育成を行ったところ、育成期間 20 日で *c* 軸方向に 3.0 mm 長の大型ニワトリ卵白リゾチーム結晶が得られた。結晶の成長速度は、攪拌なしの場合が 0.03 mm/day であったのに対し、攪拌ありの場合は 0.07 mm/day と 2 倍以上も速かった。溶液攪拌により種結晶への溶質供給が促進され、結晶がより高速に成長したと指摘した。さらに、溶液攪拌により溶液濃度を均一化することで、雑晶の発生が抑制できることを示した。

参考文献

- [1] 柿本浩一: 流れのダイナミクスと結晶成長, 共立出版 (2002)
- [2] W. Littke and C. John: *Science* **255** (1984) 203.
- [3] L.J. DeLucas, F.L. Suddath, R. Snyder, R. Naumann, M.B. Broom, M. Pusey, V. Yost, B. Herren, D. Carter, B. Nelson, E.J. Meehan, A. McPherson and C.E. Bugg: *J. Cryst. Growth* **76** (1986) 681.
- [4] A. McPherson, A. Greenwood and J. Day: *Adv. Space Res.* **11** (1991) 343.
- [5] A. McPherson: *Trends Biotech.* **15** (1997) 197.
- [6] N.E. Chayen, E.H. Snell, J.R. Helliwell and P.F. Zagalsky: *J. Cryst. Growth* **171** (1997) 219.
- [7] A. McPherson, A.J. Malkin, Y.G. Kuznetsov, S. Koszelak, M. Wells, G. Jenkins, J. Howard and G. Lawson: *J. Cryst. Growth* **196** (1999) 572.
- [8] F. Otálora, M.L. Novella, D. Rondón and J.M. García-Ruiz: *J. Cryst. Growth* **196** (1999) 649.
- [9] 田仲広明, 佐藤勝, 桑原啓一: 日本マイクログラビティ応用学会誌 **18** (2001) 233.
- [10] L.J. DeLucas, K.M. Moore, M.M. Long, R. Rouleau, T. Bray, W. Crysel and L. Weise: *J. Cryst. Growth* **237-239** (2002) 1646.
- [11] C.P. Lee and A.A. Chernov: *J. Cryst. Growth* **240** (2002) 531.
- [12] B. Lorber: *Biochem. Biophys. Acta (BBA) –Proteins & Proteomics* **1599** (2002) 1.
- [13] 高妻孝光, 渡辺博義信, 吉崎泉, 山中亜利, 中村裕彦: 日本結晶成長学会誌 **29** (2002) 385.
- [14] M.A. Larson and J. Garside: *Chem. Eng. Sci.* **41** (1986) 1285.
- [15] Y.-C. Kim and A.S. Myerson: *J. Cryst. Growth* **143** (1994) 79.
- [16] T. Azuma, K. Tsukamoto and I. Sunagawa, *J. Cryst. Growth* **98** (1989) 371.
- [17] D. Elwell and H.J. Scheel: *Crystal Growth from High-Temperature Solutions*, Academic Press, London (1975)
- [18] K. Nakai, T. Kamimura, H. Sawada, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *Tech. Dig. CLEO/Pacific Rim '99* (1999) 2.71.
- [19] A.E. Kokh and N.G. Kononova: *Solid-State Elect.* **44** (2000) 819.
- [20] 小野利一, 神村共住, 福本悟, 西岡志行, 吉村政志, 森勇介, 佐々木孝友: レーザー研究 **30** (2002) 538.
- [21] T. Kamimura, R. Ono, Y.K. Yap, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **40** (2001) L111.
- [22] R. Ono, T. Kamimura, S. Fukumoto, Y.K. Yap, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki and K. Yoshida: *J. Cryst. Growth* **237-239** (2002) 645.

第 5 章 溶液攪拌によるタンパク質結晶の育成

- [23] N. Niimura, Y. Minezaki, T. Nonaka, J.-C. Castagna, F. Cipriani, P. Hoghoj, M.S. Lehmann and C. Wilkinson: *Nature Struct. Bio.* **4** (1997) 909.
- [24] K. Izumi, S. Sawamura and M. Ataka: *J. Cryst. Growth* **168** (1996) 106.
- [25] I. Dobrianov, C. Caylor, S.G. Lemay, K.D. Finkelstein and R.E. Thorne: *J. Cryst. Growth* **196** (1999) 511.
- [26] K. Izumi, K. Taguchi, Y. Kobayashi, M. Tachibana, K. Kojima and M. Ataka: *J. Cryst. Growth* **206** (1999) 155.
- [27] S.D. Durbin and W.E. Carlson: *J. Cryst. Growth* **122** (1992) 71.
- [28] J.H. Konnert, P. D'Antonio and K.B. Ward: *Acta Cryst.* **D50** (1994) 603.
- [29] A.J. Malkin, Y.G. Kuznetsov and A. McPherson: *J. Cryst. Growth* **196** (1999) 471.
- [30] T. Nakada, G. Sazaki, S. Miyashita, S.D. Durbin and H. Komatsu: *J. Cryst. Growth* **196** (1999) 503.
- [31] L. Rong, T. Yamane and N. Niimura: *J. Cryst. Growth* **217** (2000) 161.
- [32] M. Wiechmann, O. Enders, C. Zeilinger and H.-A. Kolb: *Ultramicroscopy* **86** (2001) 159.
- [33] A.J. Malkin, Y.G. Kuznetsov and A. McPherson: *J. Cryst. Growth* **232** (2001) 173.

第 6 章

結論

6.1 はじめに

現在のエレクトロニクス産業およびバイオ産業、そして将来のバイオエレクトロニクス産業において、有機材料や生体高分子材料はその優れた特性や潜在的な能力から、多くの注目を集めている。これまでの産業においては、主に無機材料が使用されてきたが、特に原子や分子が 3 次元的に規則正しく配列した状態である結晶は、物質の精密な立体構造の解析からデバイス応用までの非常に広い範囲において利用されてきた。有機材料や生体高分子材料においても、結晶が求められているが、これらの材料は難結晶育成材料であり、大型高品質結晶の育成方法の確立が大きな課題である。

本研究では、優れた非線形性を有するといわれる有機非線形光学結晶 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST) と、病気の治療や創薬、生命現象の解明などに直結すると期待されるタンパク質の立体構造・機能解析に求められるタンパク質結晶に着目し、それらの結晶育成技術の確立を目標に定め、研究を行った。特に、結晶品質の向上を目的とし、それぞれの結晶に適した独自の育成手法を提案し、その有効性を明らかにするとともに、高品質および大型の結晶作製に成功した。さらに、DAST においては、従来の無機電気光学結晶を凌駕する電気光学特性を有することを明らかにし、次世代電気光学素子への応用が可能であることを示した。

以下に、本研究で得られた成果を総括し、将来の展望を述べ、本論文の結論とする。

6.2 本研究で得られた成果

本論文は、第 1 章において本研究の意義と目的を明らかにした後、有機非線形光学結晶 DAST に関する研究（第 2 章、第 3 章）と、タンパク質結晶に関する研究（第 4 章、第 5 章）について述べた。それぞれの研究において得られた成果を以下にまとめる。

【有機非線形光学結晶 DAST に関する研究】

第2章では、有機非線形光学結晶 DAST の物理・化学的性質と結晶構造を説明し、高純度 DAST の合成法を示した後、温度降下法による高品質 DAST 結晶の育成について述べた。

- DAST 結晶の育成溶媒としてメタノールを選択し、その溶解度曲線を作成した。溶解度 S (g/l)、溶液温度 t (°C) とすると、未精製 DAST (純度 97%未満) においては $S = 5.50 \cdot e^{0.0445t}$ 、精製した高純度 DAST (純度 99.9%) においては $S = 4.96 \cdot e^{0.0448t}$ と近似できることが分かった。相関係数 R^2 はそれぞれ 0.997、0.999 であった。高純度 DAST の溶解度は、従来の未精製 DAST の溶解度より、約 9 % 小さくなっており、同量の DAST を溶かした場合、飽和点が数°C 上昇することが分かった。また、アレニウスプロットから活性化エネルギーを算出したところ、未精製および高純度 DAST のいずれも 34.8 kJ/mol であり、活性化エネルギーは等しかった。つまり、溶解度の変化は DAST の純度に起因するものと考えられる。
- 種結晶による DAST 結晶の育成において、結晶成長速度と結晶品質が強く相関していることを明らかにした。本実験では、最も低速で育成した DAST 結晶(成長速度 0.14 mm/day)の品質が、最良であった。分子構造が複雑な DAST の高品質結晶育成には、結晶を極めて低速で成長させることが、重要であることを明らかにした。
 - 偏光顕微鏡による結晶の光学的均一性を調べた結果、成長速度が遅くなるほど消光度が高くなることが分かった。成長速度 0.4 mm/day 以下で育成した DAST 結晶は、結晶全体で一様に消光し、結晶の光学的均一性が優れていた。
 - DAST (001)面の X 線回折ロッキングカーブ測定を行った結果、成長速度が遅くなるにつれて X 線回折ピークがより鋭くなり、分子配向性 (結晶性) が向上することを明らかにした。最も低速で育成した DAST 結晶 (成長速度 0.14 mm/day) が、最小の半値幅 37.4 秒を示した。ただし、本装置の入射 X 線の角度広がり、半値幅 5.2 秒であった。
 - DAST (001)面のビッカース硬度測定を行った結果、結晶品質と硬度には密接な関係があることが分かった。X 線回折ロッキングカーブ半値幅が減少する (結晶成長速度が遅くなる) につれて、ビッカース硬度が増加し、最大値は 49 であった。この値は同じ有機イオン性結晶である LAP、THAMP、THAMS などと同程度あり、DAST 結晶がイオン結合に起因した比較的高い硬度を有していることを明らかにした。
- 自然核成長からの育成である Slope Nucleation 法において、下記の 4 つの改善策を行うことで高品質 DAST 結晶の育成が可能となった。得られた DAST (001)面の X 線回折ロッキングカーブ半値幅の最小値は 13 秒であり、無機高品質シリコン結晶 (111)面の半値幅 10.4 秒に迫る値であった。このような高品質 DAST 結晶の育成報告例はなく、今回が初めてである。
 - 未精製 DAST (純度 97%未満) をエタノールによる再結晶法にて精製することにより純度 99.9%の高純度 DAST 原料を得た。

- DAST 濃度 35 g/l に調整した DAST 溶液 100 ml において、スターラーによる溶液攪拌を行いながら、55℃における加熱時間 t (hour) と導電率 D (S/cm) の関係を調べた。加熱時間とともに導電率が指数関数的に高くなり、10 時間を越えると導電率は飽和し、一定値となった。この過程を Noyes-Whitney-Nernst の溶解式で近似したところ、近似式 $D = 2.91\{1 - \exp(-0.73t)\}$ が得られ、実験値とよく一致した (相関係数 $R^2=0.992$)。つまり、溶液の導電率はクラスターの分解程度を表していると考えられる。この結果から、見かけ上、溶解している溶液でも、クラスターレベルになると十分に分解されておらず、この実験条件においては、その溶解に少なくとも 10 時間程度の加熱が必要であることが分かった。
- 結晶析出開始後に溶液温度の保持、好ましくは析出開始前後において溶液温度を保持することで、析出開始後の結晶の急成長を抑制した。また、温度降下速度を一定とすることなく、結晶の成長状況を考慮した適度な温度降下を与え、可能な限り低速で結晶を成長させた。種結晶による DAST 結晶の育成において、結晶品質が成長速度に強く関連していたため、本改善策が高品質 DAST 結晶の育成に最も寄与したと考えられる。
- フロリナートを用いた比重差溶媒洗浄法と超音波洗浄により、取り出しの際に結晶表面へ DAST 微結晶が付着する問題を解決し、表面付着物の極めて少ない DAST 結晶を得た。

第3章では、有機非線形光学結晶 DAST の電気光学素子への応用として電界センサーに着目し、電気光学プロービングによる DAST 結晶の電気光学特性評価について述べた。

- DAST 結晶を電界センサーとして使用する場合、最大の電気光学定数 r_{11} を使用するには x 軸方向 (ほぼ a 軸方向) に電界を印加することと、平板状の結晶形状を考慮すると z 軸方向からレーザー光を入射させるのが得策である。この条件における DAST の電気光学性能は、屈折率を n とすると、 $|r_{11}n_x^3 - r_{21}n_y^3|$ で表されることを示した。
- 波長 1.55 μm の半導体レーザーをプローブ光として、90 kHz の正弦波信号を電気光学測定したところ、高品質 DAST 結晶の電気光学感度は、横型材料の中で最も優れた電気光学特性を有する KTP 結晶に比べて約 5 倍であり、これまでの報告例 (約 4 倍) を超える感度が得られた。また、DAST と KTP の最小検出電圧 $V_{\min}$ を算出したところ、それぞれ 3.7 mV/ $\sqrt{\text{Hz}}$ 、18.0 mV/ $\sqrt{\text{Hz}}$ であることが分かった。
- 電気光学感度の周波数特性を評価し、低周波数領域 (30 Hz~90 kHz) における DAST の優れた電気光学特性を初めて明らかにした。DAST は測定したすべての周波数において、感度がほとんど一定 (-2 dB) であったのに対し、KTP は周波数が低くなるにつれて、電気光学感度が急激に低下し (-39 dB @ 180 Hz)、180 Hz 以下の信号に対しては感度が得られなかった。この感度低下は、KTP の抵抗率が低いことと、カリウムイオンによる伝導性が誘電率を高くすることで引き起こされたと指摘した。

第 6 章 結論

- DAST を用いた高速電気信号（100 GHz 以上の周波数成分を含む）の高感度電気光学サンプリングに成功した。これは KTP で検出できなかった微弱な電界を測定した結果であり、DAST の高感度性を実証した。DAST の超高感度電界センサーへの応用が可能であることを明らかにしたのは、今回が初めてである。
- 高品質 DAST 結晶は、同一結晶内での電気光学感度ばらつきが生じず、得られた感度は測定位置に依らず一定であった。また、透過レーザー光の空間強度分布を調べたところ、DAST 結晶によるレーザー光の散乱やビームプロファイルの変化は観測されず、市販 KTP 結晶と同程度の光学的に優れた DAST 結晶であることが分かった。
- DAST を用いた電気光学測定により、入力電圧信号と同一波形の方形波および三角波電気信号の検出に成功した。方形波および三角波は、広帯域周波数成分を有する信号であることから、DAST が低周波数から高周波数までの広帯域周波数応答特性に優れていることを実証した。KTP 結晶では同じ信号を検出することができなかったことから、DAST はこれまで実現が困難であった超広帯域かつ超高感度電界センサーへの応用が可能であることを、初めて明らかにした。

【タンパク質結晶に関する研究】

第 4 章では、比重差と不溶性を利用して 2 液界面でタンパク質結晶を浮かべて育成する方法 (Two-Liquid System) を提案し、温度降下法による 2 液バッチ法と蒸気拡散によるフローティングドロップ法を用いたタンパク質の高品質および大型結晶の育成について述べた。

- 有機非線形光学結晶 DAST の自然核成長による結晶育成において実施した温度プログラムの概念に基づき、タンパク質結晶を温度降下法により育成したところ、低過飽和度下で低速成長させることが可能となり、マクロスコピックな観察から評価したところ、品質の良い結晶であることを示した。
- Two-Liquid System はタンパク質結晶を 2 液界面で浮かべて育成するため、①育成容器に付着せず、結晶品質の低下につながる応力を最小限に抑えることができること、②非常に軟らかく脆いタンパク質結晶にクラックなどの機械的な損傷を与えることなく、容易に結晶を取り出すことが可能であることを示した。また、下層液体として使用したフロリナートによるタンパク質結晶へのマクロスコピックな影響がないことを明らかにした。ただし、液体上に浮かぶタンパク質結晶は、ほとんど成長を阻害されないため、より大きな結晶が得られる可能性があることを指摘した。
- 温度降下法と Two-Liquid System (2 液バッチ法) を組み合わせることにより、高品質および大型タンパク質結晶を育成するための手法が確立できる可能性を明示した。
- Two-Liquid System は種結晶を容易に導入できるため、種結晶による大型タンパク質結晶の育

成を行い、25 日間で 2.5 mm 長 (c 軸方向)のニワトリ卵白リゾチーム結晶を得た。この結晶の成長速度は自然核成長の成長速度より遅い 0.03~0.04 mm/day であり、低速で安定した成長制御が、大型タンパク質結晶の作製を可能にすることを実証した。

- Two-Liquid System の蒸気拡散法への応用であるフローティングドロップ法で得られた結晶の品質は、現在、高品質タンパク質結晶の育成に広く用いられているハンギングドロップ法と同程度であることを示した。また、フローティングドロップ法は、従来のハンギングドロップ法およびシッティングドロップ法の利点を合わせ持つ、優れた特長を有することから、蒸気拡散法の中で、タンパク質結晶の育成に最も適した方法である可能性を示した。

第5章では、従来のタンパク質結晶の育成において、有害無益とされてきた溶液攪拌による結晶育成を提案した。タンパク質結晶の育成に適応する新しい溶液攪拌法(FAST: Floating And Stirring Technique)を考案し、その有効性と大型タンパク質結晶の育成について述べた。タンパク質結晶の育成において、溶液攪拌を積極的に応用したのは、今回が初めてである。

- Two-Liquid System を発展させた FAST は、液体を介したスターラーによる間接攪拌であることから機械的な刺激が少なく、攪拌強度は、回転速度、回転子の形状、下層液体の容量や粘度を変化させることにより、任意に制御できる。そのため、タンパク質が変性することなく、かつ、結晶に機械的な損傷を与えない程度の緩やかな溶液攪拌を実現できることを明らかにし、FAST がタンパク質結晶の育成に適応する、優れた攪拌法であることを明示した。
- FAST による刺激の少ない適度な溶液攪拌を行うことにより、同条件下で溶液攪拌をしない結晶育成に比べて、自然核成長による結晶の析出数が減少し、得られる結晶サイズが大きくなることを実証した。
- 溶液攪拌による種結晶の育成を行ったところ、育成期間 20 日で c 軸方向に 3.0 mm 長の大型ニワトリ卵白リゾチーム結晶が得られた。結晶の成長速度は、攪拌なしの場合が 0.03 mm/day であったのに対し、攪拌ありの場合は 0.07 mm/day と 2 倍以上も速かった。溶液攪拌により種結晶への溶質供給が促進され、結晶がより高速に成長したと指摘した。さらに、溶液攪拌により溶液濃度を均一化することで、雑晶の発生が抑制できることを示した。

6.3 将来の展望

本研究では、難結晶育成材料である有機およびタンパク質の結晶育成における多くの重要な知見を得た。有機非線形光学結晶 DAST において、平板結晶を垂直に立てた状態で成長させ、接触面積を最小限とすることで、結晶品質の向上を実現した。この結果が、タンパク質結晶を液体上に浮遊させて育成する手法を考案するきっかけとなり、タンパク質結晶の新しい育成法を提案す

第6章 結論

ることに至った。また、DAST 結晶の品質が、結晶成長速度に強く相関していることを明らかにし、温度変化による精密な過飽和度制御により、結晶を低速成長させることで、無機高品質シリコン結晶の品質に迫る、高品質 DAST 結晶を得た。無機や有機の結晶育成において広く用いられている温度変化による結晶成長制御や溶液攪拌を、タンパク質結晶の育成に積極的に取り入れ、その有効性を明らかにし、タンパク質の新しい結晶育成の在り方を示した。このように、有機とタンパク質は材料や特性が大きく異なるが、基本的な結晶育成理論は同じであることが、本研究の成果を鑑みると明らかである。これらの知見は、今後の有機およびタンパク質などの難結晶育成材料の結晶育成に対して、大きな貢献を与えるものであると考える。

しかしながら、本研究でなお解明し得なかった課題も多く残されている。例えば、自然核発生に関しては、未だ制御できない大きな課題である。特に、有機やタンパク質分子のように分子量が大きい物質は、過飽和度を極めて高くしないと結晶化しない。これは準安定領域が大きいこと、つまり臨界核半径が大きいことに起因する。これと類似するが、溶液のクラスター状態の制御も結晶成長を行う上で、非常に重要な課題の一つである。著者は、レーザーによる核発生制御と、攪拌による溶液状態制御について、今後、精力的に研究を進めるとともに、その現象解明と更なる高品質結晶の作製にも取り組む予定である。

一方、有機非線形光学結晶 DAST については、次世代電気光学素子への応用に堪えうる優れた特性を有することを明らかにした。本研究にて、高品質 DAST 結晶の作製を実現し、素子応用への第一歩を踏み出せた意義は大きい。素子実現に至る過程には解決しなければならない課題がいくつか残されている。例えば、有機結晶を用いたデバイス実現において、結晶の加工が大きな障壁となる。DAST の電界センサー応用に関しては、結晶の光学研磨と、無反射コーティングおよび反射ミラーの作製が必要となる。DAST はイオン結合に起因する比較的高い硬度を有しているが、無機結晶と比較すると、その硬度は低い。また、材料の融点が 256℃であることから、低温での加工処理に限定されるなど、従来の無機結晶に対して施してきた加工プロセスを、そのまま DAST に適応することは難しいと考えられる。現在、DAST の加工方法に関して、産学連携により検討を進めており、DAST を用いた次世代高性能デバイスの実現に向けて、今後も鋭意努力する次第である。

著者は、本研究成果にとどまることなく、結晶育成およびその実用化に関する更なる研究を持続し、学術的かつ工業的に社会貢献できるよう精進してゆく所存である。有機およびタンパク質などの新しい材料により実現されたデバイスやシステムなどが、社会の一躍を担う日が来ることを信じて、本論文を結びたい。

謝辞

本研究は大阪大学大学院工学研究科電気工学専攻電気材料・物性工学講座電気物性工学領域において行われたものであります。終始、ご指導およびご鞭撻を賜りました佐々木孝友教授に衷心より感謝の意を表すとともに御礼の言葉を申し上げます。

本論文の作成にあたり、貴重な時間を割いて直接のご指導、ご助言を賜りました伊藤利道教授、中塚正大教授に深謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、適切かつ有益なご指導、ご助言、および多大なご協力を賜りました森勇介助教授、吉村政志助手、高野和文助手、胡章貴助手に感謝の意を表します。

大学院在学中にご指導とご高配を賜りました伊瀬敏史教授、熊谷貞俊教授、辻毅一郎教授、山中龍彦教授、斗内政吉教授ほか諸先生方に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり有機非線形光学結晶 DAST の研究に関して、多大なご助言、ご協力をいただきました東北大学多元物質科学研究所の中西八郎教授、戒能俊邦教授、岡田修司助教授、東北大学電気通信研究所の伊藤弘昌教授、宮崎大学工学部電気電子工学科の横谷篤至助教授、慶應義塾大学理工学部電子工学科梅垣真祐教授、第一化学薬品株式会社の橋浦十八氏、露口文章氏、黒澤敏氏、深作昇氏、横田宏明氏、落合雄太氏、NTT マイクロシステムインテグレーション研究所の永妻忠夫博士、佐々木愛一郎氏、株式会社光学技研の岡田幸勝氏、田中光弘氏に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行にあたりタンパク質結晶の研究に関して、多大なご助言、ご協力をいただきました大阪大学大学院工学研究科物質・生命工学専攻の金谷茂則教授、森川正章助教授、大阪大学大学院工学研究科物質化学専攻の甲斐泰教授、井上豪助教授、松村浩由助手、大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻の増原宏教授、大阪大学大学院理学研究科宇宙地球科学専攻の徳永史生教授、大阪大学ベンチャー・ビジネス・ラボラトリーの兼松泰男助教授、細川陽一郎博士、濱田格雄博士、中村亮介博士、黒川敦彦氏、東北大学学際科学研究センターの佐崎元講師、産業技術総合研究所の安宅光雄博士、サイボックス株式会社の佐藤節哉氏、松本由多加氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際し、終始多大なご助力、ご意見をいただきました高橋義典氏(現 オリンパス光学工業株式会社)、藪崎純子さん、岩井敬氏(現 株式会社東芝)、渡辺隆裕氏(現 古川電気工業株式会社)、常定扶美さん、長岡一聡氏、肥後輝明氏に深く感謝いたします。

学位論文執筆の苦楽を共にした三上祐史氏、紀和利彦氏、P. Sompob 氏に深く感謝いたします。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始お世話になりました葉玉牽博士(現 Michigan Technological University 助教授)、神村共住博士(現 高知工業高等専門学校電気工学科助手)、中尾日六士博士(堺化学工業株式会社)、川村史朗博士、大前邦途博士、S. Brahadeeswaran 博士、村松研一氏(ニコン株式会社)、北野博史氏(ニコン株式会社)、田中寿賢氏、波多野智氏(ネオアーク株式会社)、牛山直樹氏(現 松下電工株式会社)、小野利一氏(現 ソニー株式会社)、恩田衛氏(現 シャープ株式会社)、川村憲一郎氏(現 株式会社村田製作所)、岩橋友也氏、大塚茂樹氏、甲斐靖規氏、福本悟氏、保田繁樹氏、佐藤健一氏、首藤豊氏、西岡志行氏、Nuruzzaman A.B.M.氏、松井知代さん、森下昌紀氏、磯部宏晶氏、今出完氏、桑原涼氏、佐治隆司氏、村上敦俊氏に深く感謝いたします。

研究遂行および論文作成に際し、ご協力いただきました秘書の白井宏子さんをはじめ、電気物性工学領域諸氏に感謝いたします。

本研究は、以上に挙げきれなかった多くの方々からのご協力、ご指導、ご鞭撻により達成されたものであり、心より御礼申し上げます。

最後に、苦楽を共にし、励まし、協力して論文の完成に導いてくれた愛妻の千賀子に心から感謝いたします。また、千賀子のご両親、父、母、妹に厚く御礼申し上げます。

平成 15 年 2 月

安達宏昭
安達 宏昭

研究業績

学術論文

- [1] H. Adachi, Y. Takahashi, J. Yabuzaki, Y. Mori and T. Sasaki, "Growth of high quality nonlinear optical crystal 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium tosylate (DAST)": Journal of Crystal Growth **198/199** (1999) 568-571
- [2] H. Adachi, T. Watanabe, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki, "Growth of Protein Crystal at Interface between Two Liquids Using Slow Cooling Method": Japanese Journal of Applied Physics **41** (2002) L726 - L728
- [3] 安達宏昭, 吉村政志, 森 勇介, 佐々木孝友, "温度降下法による2液界面での高品質および大型タンパク質結晶の育成": 日本結晶成長学会誌 **29** (2002) 313 - 317
- [4] H. Adachi, K. Takano, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki, "Promotion of Large Protein Crystal Growth with Stirring Solution": Japanese Journal of Applied Physics **41** (2002) L1025 - L1027 (*Express Letter*)
- [5] H. Adachi, K. Nagaoka, F. Tsunesada, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki, A. Sasaki, T. Nagatsuma, Y. Ochiai and N. Fukasaku, "Electro-Optic Measurement Using High-Quality 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST) Crystal": Japanese Journal of Applied Physics **41** (2002) L1028 - L1030 (*Express Letter*)
- [6] 安達宏昭, 細川陽一郎, 高野和文, 常定扶美, 増原 宏, 吉村政志, 森 勇介, 佐々木孝友, "有機およびタンパク質結晶育成における短光パルスレーザーの効果": 日本結晶成長学会誌 **29** (2002) 445 - 449
- [7] H. Adachi, K. Takano, M. Morikawa, S. Kanaya, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki, "Application of a two-liquid system to sitting-drop vapour diffusion protein crystallization": Acta Crystallographica Section D **59** (2003) 194-196
- [8] H. Adachi, K. Nagaoka, F. Tsunesada, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki, A. Sasaki, T. Nagatsuma, Y. Ochiai and N. Fukasaku, "High-Quality Organic 4-dimethylamino- N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST) Crystal for Electro-Optic Measurement Applications": The Institute of Electronics, Information and Communication Engineers (IEICE) Transactions on Electronics (in press).

研究業績

- [9] H. Adachi, K. Takano, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki, "Application of a Stirring Method to Micro-Scale and Vapor Diffusion Protein Crystallization": Japanese Journal of Applied Physics (submitted).
- [10] H. Adachi, K. Takano, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki, "Effective Protein Crystallization Using Crystal Hysteresis": Japanese Journal of Applied Physics (submitted).
- [11] J. Yabuzaki, Y. Takahashi, H. Adachi, Y. Mori and T. Sasaki, "High-quality crystal growth and characterization of organic nonlinear optical crystal: 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium tosylate (DAST)": Bulletin of Materials Science **22** (1999) 11-13
- [12] F. Tsunesada, T. Iwai, T. Watanabe, H. Adachi, M. Yoshimura, Y. Mori, and T. Sasaki, "High-Quality Crystal Growth of Organic Nonlinear Optical Crystal DAST": Journal of Crystal Growth **237-239** (2002) 2104-2106

Proceedings

- [1] Y. Takahashi, J. Yabuzaki, H. Adachi, Y. Mori and T. Sasaki, "High-quality Crystal Growth and Characterization of Organic Nonlinear Optical Crystal: 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST)": Nonlinear Optics **22** (1999) 267-270
- [2] F. Tsunesada, H. Adachi, K. Nagaoka, T. Higo, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki, Y. Ochiai, H. Yokota and N. Fukasaku, "High-quality organic DAST crystal for nonlinear optical applications": to be published in a special issue of The Review of Laser Engineering.

国際会議発表

- [1] H. Adachi, Y. Mori and T. Sasaki, "Growth and Characterization of Organic Nonlinear Optical 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST) Crystal": International Symposium on Laser and Nonlinear Optical Materials 1997, Singapore, November 1997
- [2] H. Adachi, Y. Mori, Y. Takahashi and T. Sasaki, "Growth of High Quality Nonlinear Optical Crystal: 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST)": The Twelfth International Conference on Crystal Growth, Jerusalem, Israel, July 1998
- [3] H. Adachi, T. Higo, K. Nagaoka, F. Tsunesada, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki, Y. Ochiai, H. Yokota and N. Fukasaku, "Growth of High-quality Organic DAST Crystal for Electro-optic

- Applications": The 2nd Asian Conference on Crystal Growth and Crystal Technology, Seoul, Korea, August 2002
- [4] H. Adachi, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki, "Growth of High-quality and Large Protein Crystal at Interface of Two Liquids Using Slow Cooling Method": The 2nd Asian Conference on Crystal Growth and Crystal Technology, Seoul, Korea, August 2002
- [5] H. Adachi, K. Nagaoka, F. Tsunesada, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki, A. Sasaki, T. Nagatsuma, Y. Ochiai and N. Fukasaku,, "High-quality Organic 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST) Crystal for Electro-optic Measurement Applications": 2002 International Topical Meeting on Microwave Photonics, Awaji, Japan, November 2002
- [6] Y. Takahashi, J. Yabuzaki, H. Adachi, Y. Mori and T. Sasaki, "High-Quality Crystal Growth and Characterization of Organic Nonlinear Optical Crystal: 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST)": 4th International Conference on Organic Nonlinear Optics, Hokkaido, Japan, October 1998
- [7] Y. Mori, Y. Takahashi, J. Yabuzaki, H. Adachi and T. Sasaki, "High-Quality Crystal Growth and Characterization of Organic Nonlinear Optical Crystal: 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate (DAST)": 5th IUMRS (International Union of Material Research Societies) International Conference in Asia, Bangalore, India, October 1998
- [8] T. Watanabe, H. Adachi, K. Takano, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki, "Crystal growth of lysozyme in supersaturated solution using slow cooling method": The 13th International Conference on Crystal Growth, Kyoto, Japan, August 2001
- [9] F. Tsunesada, T. Watanabe, T. Iwai, H. Adachi, M. Yoshimura, Y. Mori and T. Sasaki, "High-Quality Crystal Growth of Organic Nonlinear Optical Crystal DAST": The 13th International Conference on Crystal Growth, Kyoto, Japan, August 2001
- [10] T. Sasaki, H. Adachi, K. Nagaoka, F. Tsunesada, T. Watanabe, Y. Ochiai, M. Yoshimura and Y. Mori, "Crystal Growth of High-Quality Organic Nonlinear Optical Crystal DAST": International Symposium on Organic Electric and Photonic Materials and Devices, Osaka, Japan, November 2001
- [11] F. Tsunesada, T. Higo, K. Nagaoka, H. Adachi, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki, Y. Ochiai, H. Yokota and N. Fukasaku, "High-quality organic DAST crystal for nonlinear optical applications": The Third Asian Pacific Laser Symposium, Osaka, Japan, September 2002

研究業績

出願特許

- [1] 安達宏昭, 渡辺隆裕, 高野和文, 吉村政志, 森 勇介, 佐々木孝友, "結晶育成方法"
2001 年 12 月 12 日出願, 特願 2001-379288
- [2] 安達宏昭, 吉村政志, 森 勇介, 佐々木孝友, 細川陽一郎, 増原 宏, "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": 2002 年 8 月 26 日出願, 特願 2002-245700
- [3] 安達宏昭, 常定扶美, 長岡一聡, 吉村政志, 森 勇介, 佐々木孝友, "有機光学単結晶の製造方法": 2002 年 8 月 27 日出願, 特願 2002-247372
- [4] 安達宏昭, 常定扶美, 長岡一聡, 吉村政志, 森 勇介, 佐々木孝友, "有機光学単結晶およびそれを用いる電界検出装置": 2002 年 9 月 13 日出願, 特願 2002-268883
- [5] 安達宏昭, 常定扶美, 長岡一聡, 吉村政志, 森 勇介, 佐々木孝友, "電界検出方法および装置"
2002 年 9 月 26 日出願, 特願 2002-281775
- [6] 安達宏昭, 渡辺隆裕, 高野和文, 吉村政志, 森 勇介, 佐々木孝友, "結晶育成方法"
2002 年 11 月 8 日出願, 特願 2002-324864
- [7] 安達宏昭, 渡辺隆裕, 高野和文, 吉村政志, 森 勇介, 佐々木孝友, "結晶育成方法"
2002 年 11 月 25 日出願, 特願 2002-341478
- [8] 安達宏昭, 高野和文, 吉村政志, 森 勇介, 佐々木孝友, "高分子結晶の製造方法"
2002 年 12 月 27 日出願, 特願 2002-382617

受賞リスト

- [1] 安達宏昭, "新薬開発に必要な高品質タンパク質結晶の育成技術": 第 3 回キャンパスベンチャーグランプリ OSAKA ハイテク新技術部門 優秀賞 (摂津信用金庫・日刊工業新聞社主催) 2002 年 1 月