(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2018-200233
(P2018-200233A)
(43)公開日　平成30年12月20日(2018.12.20)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01R 33/28	***(2006.01)***	G01N	24/02	B	4G047
C01G 23/04	***(2006.01)***	C01G	23/04	C	4G048
C01G 33/00	***(2006.01)***	C01G	33/00	A	4G146
C01B 32/198	***(2017.01)***	C01B	32/198		

審査請求 未請求　請求項の数 8　ＯＬ　（全 23 頁）

(21)出願番号　特願2017-105022 (P2017-105022)
(22)出願日　平成29年5月26日 (2017.5.26)

(71)出願人　503359821
国立研究開発法人理化学研究所
埼玉県和光市広沢２番１号
(71)出願人　301023238
国立研究開発法人物質・材料研究機構
茨城県つくば市千現一丁目２番地１
(74)代理人　100080089
弁理士　牛木　護
(74)代理人　100121153
弁理士　守屋　嘉高
(74)代理人　100194892
弁理士　齋藤　麻美
(72)発明者　内田紀之
埼玉県和光市広沢２番１号　国立研究開発法人理化学研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ナノシートを含むＮＭＲ測定用配向剤

(57)【要約】
【課題】
調製が容易で取扱い性、経済性及び汎用性に優れ、安定的な磁場配向が可能なナノシートを含むＮＭＲ測定用配向剤を提供する。
【解決手段】ナノシートが、ヒドロキシ基、アミノ基、アミド基、カルボニル基、カルボキシル基、スルホ基、リン酸基、イミダゾール基及びグアニジン基から選ばれる少なくとも１種の官能基を１分子中に３５個以上有し、かつ分子量１，５００以上の化合物で被覆されているＮＭＲ測定用配向剤。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ナノシートが、ヒドロキシ基、アミノ基、アミド基、カルボニル基、カルボキシル基、スルホ基、リン酸基、イミダゾール基及びグアニジン基から選ばれる少なくとも１種の官能基を１分子中に３５個以上有し、かつ分子量１，５００以上の化合物で被覆されているＮＭＲ測定用配向剤。
【請求項２】
前記ナノシートの厚みが０．５～３ｎｍ、前記ナノシートの大きさが１００ｎｍ～１００μｍである請求項１記載のＮＭＲ測定用配向剤。
【請求項３】
前記ナノシートが酸化チタン、酸化ニオブ及び酸化グラフェンから選ばれる少なくとも１種のナノシートである請求項１又は２に記載のＮＭＲ測定用配向剤。
【請求項４】
前記ヒドロキシ基、アミノ基、アミド基、カルボニル基、カルボキシル基、スルホ基、リン酸基、イミダゾール基及びグアニジン基から選ばれる少なくとも１種の官能基を１分子中に３５個以上有し、かつ分子量１，５００以上の化合物が、タンパク質、タンニン酸、ポリジアリルジメチルアミンクロライド及びコンドロイチン硫酸から選ばれる少なくとも１種である請求項１～３のいずれか１に記載のＮＭＲ測定用配向剤。
【請求項５】
前記タンパク質が、カゼイン、リゾチーム及びアルブミンから選ばれる少なくとも１種である請求項４に記載のＮＭＲ測定用配向剤。
【請求項６】
タンパク質、タンニン酸、ポリジアリルジメチルアミンクロライド及びコンドロイチン硫酸から選ばれる少なくとも１種で被覆されている酸化チタンナノシート。
【請求項７】
カゼインで被覆されている酸化ニオブナノシート。
【請求項８】
カゼインで被覆されている酸化グラフェンナノシート。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は磁場中にて自発配向するナノシートをタンパク質等の特定化合物で被覆したＮＭＲ測定用配向剤に関する。
【背景技術】
【０００２】
タンパク質の構造解析の手法としては、Ｘ線結晶構造解析や核磁気共鳴（ＮＭＲ）を利用した解析手法が確立されている。
【０００３】
Ｘ線結晶構造解析は、結晶化した測定対象にＸ線を照射し、そのときの回折現象を測定することで、タンパク質の立体構造を予測しようとするものである。この場合、測定対象の分子量に制限がないため、非常に大きな化合物を測定対象とすることができる。当然ながら、この手法は結晶化できないサンプルには適応できない。またＸ線結晶構造解析は、本来、静止した構造を原子レベルの精度で測定しようとするものなので、生体分子等の動的な解析には不向きである。
【０００４】
一方、核磁気共鳴（ＮＭＲ）を利用した構造解析手法は結晶化のプロセスを必要とせず、核のまわりの局所構造や運動性に関する情報を非破壊的に取得することができる。特に、残余双極子結合（ＲＤＣ）、核四極子相互作用、化学シフト等の異方性項を測定することで、近距離にある原子の相対距離、角度に関する情報のみならず、外部磁場を基準として、互いに離れた原子同士の角度、距離に関する情報を取得することができる。これによ

り、より精密なタンパク質の立体解析が可能となる。
【０００５】
通常、測定対象となる分子は溶媒中でランダムな熱運動をしている。残余双極子結合（ＲＤＣ）等の異方性項を測定するためには、測定対象の分子を磁場配向させる必要があるが、静磁場に対し一定の方向に配向する性質を持つメディア（以下配向剤とよぶ）を併用することで、測定対象となる分子を配向させ、以ってＮＭＲの精度を向上させることができる。
【０００６】
一般に利用可能な配向剤としては、脂質二重膜構造を有するミセルであって、円盤状の形状をしているバイセルと呼ばれる脂質会合体が知られている（特許文献１）。バイセルはアルキル鎖の長いリン脂質と短いリン脂質からなり、Ｐ＝Ｏ結合の磁化率の異方性によって静磁場に対して配向する。配向したバイセルが測定対象となる分子と相互作用を繰り返すことにより、対象分子を磁場に対して配向させることができる。
【０００７】
また、ｐｆ１と呼ばれる繊維状ファージを用いた配向剤も一般に利用可能である（非特許文献1）。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００８】
【特許文献１】特開２００１－８９９４６号公報
【非特許文献】
【０００９】
【非特許文献１】Hansen MR, Mueller L, Pardi A.(1998) Nat Struct Biol Dec;5(12):1065-74
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
しかしながら、測定対象の分子を、バイセルを用いて配向させる場合には、バイセルの濃度を比較的高濃度に調整しなければならない。バイセルは単位重量あたりのコストが高いので、バイセルを用いた高濃度の配向剤は経済的に好ましくない。さらに、バイセルを磁場によって自発磁場配向させるためには、バイセルを含有する溶液温度を約３０～５０℃という限られた範囲に調整する必要がある。つまりバイセルを用いた配向剤は調製が難しいという問題がある。さらに、配向剤や測定対象の分子を使用後に回収できないという問題もある。
【００１１】
繊維状ファージ（ｐｆ１）を用いた配向剤は、低濃度で機能するものの、バイセルよりも高価格である。また、繊維状ファージを用いた配向剤は測定対象の分子に合わせた表面修飾ができないため、測定対象の分子が非常に限られ汎用性が低い。加えて、配向剤にファージを用いるため、使用に際して適切なバイオハザード対策が必要となる問題がある。
【００１２】
従って、本発明の目的は、上記従来技術の問題点を解消し、調製が容易で取扱い性、経済性及び汎用性に優れ、安定的な磁場配向が可能なＮＭＲ測定用配向剤を提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【００１３】
本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究した結果、下記のナノシートが上述した課題を解決できることを見出し、本発明を完成した。
即ち、本発明は、次の発明を提供するものである。
【００１４】
＜１＞

ナノシートが、ヒドロキシ基、アミノ基、アミド基、カルボニル基、カルボキシル基、リン酸基、イミダゾール基及びグアニジン基から選ばれる少なくとも１種の官能基を１分子中に３５個以上有し、かつ分子量１，５００以上の化合物で被覆されているＮＭＲ測定用配向剤。

【００１５】

＜２＞

前記ナノシートの厚みが０．５～３ｎｍ、前記ナノシートの大きさが１００ｎｍ～１００μｍである＜１＞記載のＮＭＲ測定用配向剤。

【００１６】

＜３＞

前記ナノシートが酸化チタン、酸化ニオブ及び酸化グラフェンから選ばれる少なくとも１種のナノシートである＜１＞又は＜２＞に記載のＮＭＲ測定用配向剤。

【００１７】

＜４＞

前記ヒドロキシ基、アミノ基、アミド基、カルボニル基、カルボキシル基、スルホ基、リン酸基、イミダゾール基及びグアニジン基から選ばれる少なくとも１種の官能基を１分子中に３５個以上有し、かつ分子量１，５００以上の化合物が、タンパク質、タンニン酸、ポリジアリルジメチルアミンクロライド及びコンドロイチン硫酸から選ばれる少なくとも１種である＜１＞～＜３＞のいずれか１に記載のＮＭＲ測定用配向剤。

【００１８】

＜５＞

前記タンパク質が、カゼイン、リゾチーム及びアルブミンから選ばれる少なくとも１種である＜４＞に記載のＮＭＲ測定用配向剤。

【００１９】

＜６＞

タンパク質、タンニン酸、ポリジアリルジメチルアミンクロライド及びコンドロイチン硫酸から選ばれる少なくとも１種で被覆されている酸化チタンナノシート。

【００２０】

＜７＞

カゼインで被覆されている酸化ニオブナノシート。

【００２１】

＜８＞

カゼインで被覆されている酸化グラフェンナノシート。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１】酸化チタンナノシートの模式図である。

【図２】磁場配向している酸化チタンナノシートの概略図である。

【図３】磁場配向している酸化ニオブナノシート及び酸化グラフェンナノシートの概略図である。

【図４Ａ】ナノシート分散液の写真である。

【図４Ｂ】塩化ナトリウム存在下でのナノシート分散液の写真である。

【図５Ａ】コーティング剤なしのナノシートの動的光散乱（ＤＬＳ）法による大きさ分布を表すグラフである。

【図５Ｂ】ナノシートの動的光散乱（ＤＬＳ）法による大きさ分布を表すグラフである。

【図６Ａ】コーティング剤なしのナノシートの透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）画像である。

【図６Ｂ】コーティング剤でコートされたナノシートの透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）画像である。

【図７】ナノシートの原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）画像である。

【図８】ナノシートの製造時に用いたタンパク質の量とナノシートに吸着したタンパク質の量との相関を表すグラフである。

【図９】ＣＢＢ染色によるタンパク質コート前後のナノシートの吸収スペクトルである。
【図１０】タンパク質吸着量の経時変化を表すグラフである。
【図１１】蛍光ラベルしたモデル化合物とナノシート混合液の共焦点レーザー顕微鏡画像である。
【図１２】ナノシートのＸ線小角散乱（ＳＡＸ）解析の概略図及びナノシートのＸ線小角散乱（ＳＡＸ）解析画像である。
【図１３】コーティング剤なしのナノシート分散液中におけるD_2O四極子相互作用の分裂ピークである。
【図１４】コーティング剤でコートされたナノシート分散液中におけるD_2O四極子相互作用の分裂ピークである。
【図１５】^{13}Cラベルしたグルコースの^{13}C－ＮＭＲ測定結果である。
【図１６】ＴｉＮＳ^{Cas}及びＮｂＮＳ^{Cas}のＩＰＡＰ－ＨＳＱＣスペクトルである。
【図１７】ＴｉＮＳ^{Cas}及びＮｂＮＳ^{Cas}のＩＰＡＰ－ＨＳＱＣスペクトル解析から算出したＲＤＣの結果をまとめた図である。
【図１８】ＴｉＮＳ^{Cas}のＩＰＡＰ－ＨＳＱＣスペクトル解析から算出したＲＤＣと既報の構造から計算されたＲＤＣとの相関を表すグラフである。
【図１９】ＴｉＮＳ^{Cas}及びＴｉＮＳの遠心分離後の上澄み液のＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００２３】
ナノシート
本明細書において「ナノシート」とは、ナノスケールの厚みを持つシートを指す。ナノシートの厚みは、原理的には原子一つ分の厚みまで薄くすることができるが、一般的に０．５ｎｍ以下のナノシートは作製が難しい。本発明のナノシートの厚みは、後述するコーティング剤を含めないで０．５～３．０ｎｍが好ましく、１．０～２．５ｎｍがより好ましい。また、コーティング剤を含めたナノシートの厚みは１０ｎｍ以下であることが好ましい。なお、本発明において、ナノシートの厚みは、原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）によって観察される任意の箇所の断面プロファイルから算出した値をいう。
本発明のナノシートの大きさは、磁場配向性の観点から１００ｎｍ以上が好ましい。ナノシートの大きさは溶液に分散する限り大きいことが好ましいが、実際、上限値としては１００μｍ程である。
なお、本発明において、ナノシートの大きさとは、ナノシートの広がり方向の大きさを意図するものであり、動的光散乱法によって測定した体積基準の頻度分布において累積頻度で５０％となる粒径として算出された値をいう。
したがって、典型的なナノシートの大きさは数μｍ、厚みは数ｎｍのオーダーであって、この場合、厚みに対する大きさのアスペクト比は約１：10^3である。
【００２４】
本発明では、ナノシートとして、外部磁場に対する磁場感受率が異方的性質を示すものを用いる。この種のナノシートに外部から磁場を加えると、ナノシートが磁場を感じる度合（磁場感受率）が磁場の印加方向によって異なるため、エネルギー的に最も安定な方向、つまり磁場とナノシートの相互作用ポテンシャルが最小となる方向にナノシートが配向する。
【００２５】
このようなナノシートは公知の方法を用いて製造することが可能で、特に層状の前駆体を単層化することで表面積の大きなナノシートを得ることができる。大きな表面積が得られることにより、より大きな磁場配向性を得ることができる。本発明のナノシートは、被覆のないナノシートのみの状態で水、グルコース等の糖類などの小分子を配向させることが可能である。加えて、ナノシートを後述するタンパク質等のコーティング剤で被覆することで、分子量の大きなタンパク質を溶液中にて磁場配向させることも可能となる。
ナノシートの磁場配向は、ナノシートを構成する原子の磁化異方性の総和が溶液中の自

由運動よりも上回ったときに起こる。異方性の大きさに差はあるものの、全てのナノシートは磁化異方性がある原子から構成されているため、ナノシートの大きさが十分に大きければ、理論上は構成する原子の種類や組成によらず、すべてナノシートは配向する。このため、本発明のナノシートとしては、磁場配向性を有するナノシートであればその種類や組成は問わないが、例えば、以下のものが挙げられる。

【００２６】

$Ti_{0.91}O_2$、$Ti_{0.87}O_2$、Ti_3O_7、Ti_4O_9、Ti_5O_{11}等の酸化チタンナノシート；Nb_3O_8、Nb_6O_{17}、$Ca_2Nb_3O_{10}$等の酸化ニオブナノシート；酸化グラフェン；グラフェン；ボロンナイトライド(h-BN)；グラフィティックカーボンナイトライド(g-C_3N_4)；ポリ乳酸、ポリチオフェン、ポリスチレン等のナノシート；DNA（DNA折り紙）；金属有機構造体(Molecular organic framework; MOF) ナノシート；共有結合性有機構造体(Covalent organic framework; COF) ナノシート；黒リンナノシート；ペプトイドのナノシート；ハイドロキシアパタイト($Ca_5(PO_4)_3(OH)$)、NbS_3、$NbSe_3$、$NbTe_3$、Ti、Ti-Ni、Zn-Ti、Zn-Al、Pd、Co_9Se_8、TiS_3、$TiSe_3$、$TiTe_3$、TaS_3、$TaSe_3$、$TaTe_3$、$MnPS_3$、$CdPS_3$、$NiPS_3$、$Mn_{0.5}Fe_{0.5}PS_3$、$MoCl_2$、MoS_2、$RuCl_2$、$CrCl_2$、BiI_3、BiS_3、$PbCl_4$、V_2O_5、MoO_3、TaO_3、WO_3、$HNbWO_6$、$HTaWO_6$、HNb_3O_8、MnO_2、$Na_x(Mn^{4+},Mn^{3+})_2O_4$、$Sr_2RuO_4$、$KCa_2Nb_3O_{10}$、$H_2W_2O_7$、$LaNb_2O_7$、$La_{0.90}Eu_{0.05}Nb_2O_7$、$Eu_{0.56}Ta_2O_7$、$Sr_2RuO_4$、$Sr_3Ru_2O_7$、$SrTa_2O_7$、$Bi_2SrTa_2O_9$、$Sr_2Nb_3O_{10}$、$NaCaTa_3O_{10}$、$CaLaNb_2TiO_{10}$、$La_2Ti_2NbO_{10}$、$Ba_5Ta_4O_{15}$、LaOCuCh (Ch: カルケノイドおよびその誘導体)、$Sr_2MO_2Cu_{2-\delta}S_2$(M = Mn, Co, Ni)、$Sr_2MnO_2Cu_{2m-0.5}S_{m+1}$(m = 1-3)、$Sr_4Mn_3O_{7.5}$、$Cu_2Ch_2$(Ch=S, Se)、LaOFeAs、VOCl、CrOCl、FeOCl、NbO_2F、WO_2Cl_2、$FeMoO_4Cl$、GaX (X = S, Se, Te)、InX (X = S, Se, Te)、$CaHPO_4$、$M^{n+}_{x/n}\cdot yH_2O[Al_{4-x}Mg_x](Si_8)O_{20}(OH)_4$(M: カチオン)、$[(Mg_3)(Si_2O_5)_2(OH)_2]$、$[Mg_6Si_6Al_2O_{20}(OH)_4]$ $[M^{n+}_{1/n}]$ (Mg_6) (M: カチオン)、$[(MgFe)_3(Si_3Al)O_{10}(OH)_2]K$、$[(Mg_6)(Si_6Al_2)O_{20}(OH)_4]Ba$、$[Mg_{11/4}(Si_6Al_2)O_{20}F_4][(M^{2+})_{3/2}$(M: カチオン)、$[(Al_2)(Si_2Al_2)O_{10}(OH)_2]Ca$、$[(Al_2)(Si_3Al)O_{10}(OH)_2]K$、$[Al_4Si_4O_{10}](OH)_8$、$Al_4Si_4O_{10}(OH)_8.4H_2O$、$(Mg^{2+}_x, Mg^{3+}_x(OH)_2$ $(A^{n-})_{x/n}\cdot yH_2O)$ (A: アニオン)、Ti_3C_2等のナノシート

【００２７】

上記した中でも、本発明のナノシートとしては、酸化チタン、酸化ニオブ及び酸化グラフェンのナノシートが特に好ましい。

【００２８】

酸化チタンナノシート

酸化チタンナノシートは二次元的なナノ構造を有し、層状チタン酸化合物の単結晶を、温和な条件にて化学処理し、結晶構造の基本最小単位である層1枚にまで剥離することにより得ることができる。酸化チタンナノシートは非常に大きい軸比の形状を持っており、例えば$Ti_{0.87}\square_{0.13}O_2$（□：空孔）の結晶構造を有する酸化チタンは、厚さ約０．７５ｎｍ、横幅が数μｍとなる（図１を参照）。この種のナノシートは磁場による配向軸がナノシートの厚み方向であり、また高密度の負電荷を帯びて表面積も大きいため、シート間には強い静電反発力が働いている。このため、シート間の強い静電反発力のために分散性に優れており、外部磁場中にてナノシートが層状に配列する。

【００２９】

図２は磁場配向している酸化チタンナノシートの概略図である。左図は側面図、右図は上面図を示す。記号Ｂは磁場を表し、記号Ｂ横の矢印及び中黒丸印は磁場の方向を示している。酸化チタンナノシートは外部磁場の方向がシートの法線方向に一致するように配向する。また、静電的な斥力が大きく働くため、全てのナノシートの面が同一方向を向き、互いに向かい合わせとなるように配向する性質を持つ。このため強力な配向力を有する。

【００３０】

酸化ニオブナノシート

図３は磁場配向している酸化ニオブシートの概略図である。左図は側面図、右図は上面図を示す。記号Ｂは磁場を表し、記号Ｂの脇にある矢印及び中黒丸印は磁場の方向を示している。酸化ニオブナノシートは外部磁場の方向がシートの接線方向に一致するように配

向するため、シートの接線方向となるナノシートの配向軸を中心に回転自在となっている。

【００３１】

酸化グラフェンナノシート

酸化グラフェンナノシートは、酸化ニオブナノシートと同様に外部磁場の方向がシートの接線方向に一致するように配向するため、シートの接線方向となるナノシートの配向軸を中心に回転自在となっている。

【００３２】

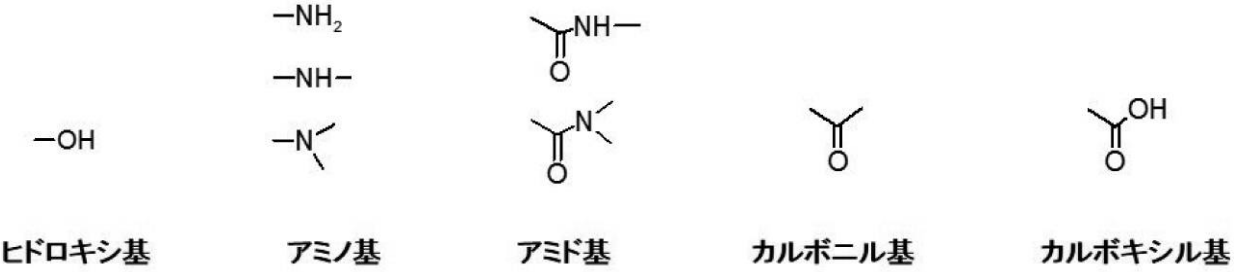
ナノシートコーティング剤

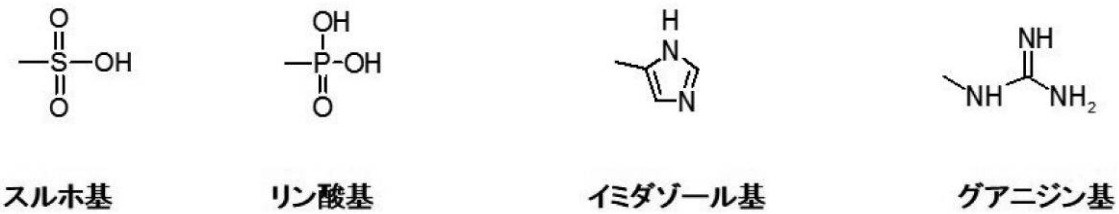
本発明のナノシートはコーティング剤で被覆することによって、グルコース等の小分子のみならず、より分子量の大きなタンパク質を磁場配向させてＮＭＲ測定することができる。そして、ナノシート表面を被覆するコーティング剤をＮＭＲ測定対象分子に応じて選択することにより、ナノシートと測定対象分子の相互作用を最適に調節し、以ってタンパク質（測定対象分子）の非特異吸着等を抑制することができる。さらに、コーティング剤による被覆によってナノシートの分散性をｐＨ及び塩の存在に大きく左右されずに保持することができる。

【００３３】

本発明のコーティング剤は、多点的にナノシートに物理吸着できる水溶性化合物である。上記コーティング剤は水素結合、双極子相互作用などを介してナノシートに吸着する。このため、本発明のコーティング剤は、以下の構造で表される、ヒドロキシ基、アミノ基、アミド基、カルボニル基、カルボキシル基、スルホ基、リン酸基、イミダゾール基及びグアニジン基から選ばれる少なくとも１種の極性を持つ官能基を１分子中に３５個以上有する化合物である。

【化１】





１分子中のヒドロキシ基、アミノ基、アミド基、カルボニル基、カルボキシル基、スルホ基、リン酸基、イミダゾール基及びグアニジン基から選ばれる少なくとも１種の官能基の数は、５０個以上であることが好ましく、１００個以上であることがより好ましい。該官能基の数の上限値は特に制限されないが、後述するタンパク質においては、通常１００～１０００個程である。

なお、本発明において、該官能基の数は、上述した官能基を１つの官能基として数えるものとする。例えば、コーティング剤がその分子中にアミド基を有する場合、該アミド基をカルボニル基とアミノ基とに分けて官能基数２と数えるのではなく、１つのアミド基と

して官能基数１と数える。

【００３４】

上記官能基数に加えて、ナノシートに物理吸着し相互作用が多点的に行われるためには、本発明のナノシートコーティング剤の分子量は１，５００以上である必要があり、１，７００以上であることが好ましい。本発明において、コーティング剤の分子量は、コーティング剤の種類に応じて適宜決定される。例えば、コーティング剤が後述するタンニン酸のような単一の化合物である場合、分子量は化学式量である。一方、コーティング剤が後述するポリジアリルジメチルアミンクロライドに代表される合成高分子化合物である場合、該化合物の分子量は、該化合物の動的光散乱法（ＤＬＳ）によって算出された、体積基準の頻度分布において累積頻度で５０％となる平均粒径から、同程度の粒径を有するポリエチレングリコール（ＰＥＧ）の分子量への換算した平均分子量である。また、コーティング剤が後述するカゼインに代表されるタンパク質である場合、当該タンパク質の分子量は、既知のアミノ酸配列の分子構造から計算で求めたものである。

コーティング剤の分子量の上限値は特に制限されないが、後述するタンパク質においては、通常一万～十万程度である。

【００３５】

上記官能基数及び分子量を有するコーティング剤としては、以下の構成単位が複数結合した高分子化合物が挙げられ、この高分子化合物は天然高分子化合物であっても合成高分子化合物であってもよい。

【００３６】

コーティング剤の構成単位としては、例えば、アルギニン、ヒスチジン、アラニン、グリシン、セリン、アスパラギン酸、リシン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、イソロイシン、ロイシン、システイン、バリン、チロシン、トリプトファン、トレオニン、アスパラギン等のアミノ酸を挙げることができる。

【００３７】

コーティング剤としては、これらアミノ酸のうち１種類を構成単位とするポリアミノ酸であってもよく、２種以上を構成単位とするポリアミノ酸であってもよい。１種類のアミノ酸を構成単位とポリアミノ酸として、ポリアルギニン、ポリヒスチジン、ポリアラニン、ポリグリシン、ポリセリン、ポリアスパラギン酸、ポリリシン、ポリグルタミン酸、ポリアラニン、ポリグルタミン、ポリメチオニン、ポリフェニルアラニン、ポリプロリン、ポリイソロイシン、ポリロイシン、ポリシステイン、ポリバリン、ポリチロシン、ポリトリプトファン、ポリトレオニン、ポリアスパラギン等が挙げられる。

【００３８】

また、２種以上のアミノ酸を構成単位とするポリアミノ酸として、カゼイン、リゾチーム、アルブミン、ペプシン、リボヌクレアーゼ、血清タンパク質、プロタミン、コンカナバリンＡ、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、トランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）、神経成長因子（ＮＧＦ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、インスリン様成長因子（ＩＧＦ）、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）、免疫グロブリン、グルコースオキシダーゼ、オボアルブミン、レクチン、フェリチン、ヘモグロビン、ミオグロビン、トリプシン、チトクロムＣ、コラーゲン、ゼラチン、ストレプアビチン、アビチン、シャペロニン、インスリン、アミロイドβ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、蛍光タンパク質（ＧＦＰ、ＢＦＰ、ＹＦＰ、ＲＦＰ）、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン、テネイシン、エラスチン、フィブリリン、エンタクチン、アミラーゼ、セルラーゼ、アルカリホスファターゼ、エステラーゼ等の各種タンパク質が挙げられる。

【００３９】

また、コーティング剤として、ポリビニルアルコール、ポリカテコール、ポリアクリルアミド、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）、ポリジメチルアクリルアミド、ポリアミドアミン、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド２－メチル１－プロパンスルホン酸、ポリウレタン、ポリウレア、ポリチオウレア、ポリエチレンイミン、ポリアクリル酸、ポリアリルアミン、ポリスチレンスルホン酸、ポリビニルスルホン酸、ポリジアリルジメチルアミンクロライド、ポリジメチルアミノエトキシメタクリレート、ポリトリメチルアミノエトキシメタクリレート塩酸塩、ポリアネトールスルホン酸等が挙げられる。

これらは単独重合体であっても、これら２種以上からなる共重合体であってもよく、共重合体である場合、各単量体の配列はランダム、ブロック、グラフトのいずれであってもよい。また、これらの重合体がイオン性電解質の場合は、その塩もコーティング剤として含まれる。

【００４０】

さらに、コーティング剤として、アガロース、キチン、キトサン、アルギン酸、ヒアルロン酸、カードラン、プルラン、セルロース、ジェランガム、デキストラン、シクロデキストラン、アルビノガラクタン、デンプン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ペクチン等の糖鎖も挙げられる。これらの糖鎖がイオン性電解質の場合は、その塩もコーティング剤として含まれる。

【００４１】

また、コーティング剤として、上述した構成単位が複数結合した高分子化合物以外に、タンニン酸のような１分子中に多数のフェノール性水酸基を有する化合物も、上記官能基数及び分子量を満たす限りにおいて使用可能である。

【００４２】

さらに、本発明のナノシートコーティング剤としては、前記化合物のうち少なくとも１種を含む混合物であってもよい。該混合物は、前記化合物を混合物中２重量％以上９９重量％未満含むものであり、２０～８０重量％含むものが好ましい。このような混合物としては、スキムミルク、寒天等を挙げることができる。

【００４３】

コーティング剤の種類は、ＮＭＲ測定対象分子に応じて適宜選択される。例えば、測定対象分子がアニオン性である場合には、ナノシートはカゼイン等のアニオン性のコーティング剤で被覆されることが好ましい。また、測定対象分子がカチオン性の分子である場合には、ナノシートはリゾチーム等のカチオン性のコーティング剤で被覆されることが好ましい。

コーティング剤の選択に際しては、例えば、コーティング剤で被覆したナノシートと蛍光ラベルした測定対象分子とを混合し、共焦点レーザー顕微鏡により観察したとき強い蛍光が観察される場合は、コーティング剤として好ましくない。これは、コーティング剤で被覆したナノシート及び測定対象分子との相互作用が強く、その配向性の妨げになるためである。一方、同様に観察したとき弱い蛍光が観察される場合は、コーティング剤で被覆したナノシートの配向性が妨げられることなく、測定対象分子と共に良好に配向するため、コーティング剤として好ましい。

【００４４】

コーティング剤によって被覆されたナノシートの調製

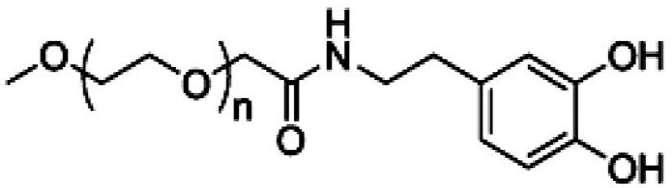
ナノシートの被覆は例えば以下の通り行うことができる。

１．ナノシートに対して過剰量のコーティング剤と、ナノシートとを、適当な溶媒中で混合する。

このとき用いる溶媒は、コーティング剤及びナノシートの組み合わせによって適宜選択される。すなわち、両者が溶解又は分散可能で、かつ両者と反応しない溶媒から適宜選択される。例えば、水、各種緩衝液、テトラメチルアンモニウム（ＴＭＡ）、テトラブチルアンモニウム（ＴＢＡ）等を用いることができる。過剰量のコーティング剤とは、通常ナノシートに対してコーティング剤を５倍重量以上とすれば十分である。

【００４５】

２．調製したコーティング剤とナノシートの混合溶液を一定時間静置する。
　このときの静置時間は、コーティング剤及びナノシートの組み合わせ、すなわち両者の相互作用の強さにより適宜決定されるが、通常数分～６０分程である。
【００４６】
３．未吸着のコーティング剤を除去するため、静置された混合溶液に遠心操作を行う。
　必要に応じて、遠心操作後に得られた沈殿物を適当な溶媒に再分散させてもよく、さらに遠心操作と再分散による洗浄を繰り返し行ってもよい。このときの遠心条件は、コーティング剤及びナノシートの種類によるが、通常１５，０００ｒｐｍ、４℃で１５分である。
【００４７】
　なお、本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書に取り込まれる。
【実施例】
【００４８】
　以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことができる。
【００４９】
［実験材料及び方法］
　コーティング剤は以下のものを用いた。
カゼイン：市販品（Wako社製）
アルブミン：市販品（Wako社製）
リゾチーム：市販品（Wako社製）
スキムミルク：市販品（Wako社製、カゼイン２７重量％含有物）
タンニン酸：市販品（Aldrich社製）
ポリジアリルジメチルアミンクロライド：市販品（Aldrich社製、平均分子量36,000、極性官能基数222／１分子）
コンドロイチン硫酸：市販品（Wako社製、平均分子量144,000、極性官能基数1787／１分子）
ＰＥＧ修飾カテコール：以下の方法により合成した。
【００５０】
ＰＥＧ修飾カテコールの合成方法
　0.025mmolのPEG-NHS（分子量10,000 g/mol、SUNBRIGHT社）と0.040 mmolのカテコール（東京化成）を0.070 mmolの4-Nメチルモルフォリン存在下、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中において一晩反応させた。その後、透析処理によって未反応分子を除去し、反応生成物である下記式に示すＰＥＧ修飾カテコール（平均分子量10,153、極性官能基数３個／１分子）を得た。なお、PEG-NHSの分子量はゲルパーミエーションクロマトグラフィー（ＧＰＣ）による、PEG換算により求めた。
【化２】



ｎ＝223（平均値）
【００５１】
　また、カゼインは過去の報告（Tomishige M, Vale RD.(1998) J Cell Biol 151:1081-9

2）を参考にし、市販のカゼインを水酸化ナトリウムで一晩塩基処理をし、その後遠心操作によって沈殿物を取り除いたものを用いた。カゼイン以外のコーティング剤は、市販品をそのまま用いた。

【００５２】

ポリジアリルジメチルアミンクロライドの分子量は、動的光散乱法(DLS)によって平均粒径を求めたところ4.17 nmであり、同程度の粒子半径を有するPEGの分子量への換算により求めた。

同様に、コンドロイチン硫酸の分子量は動的光散乱法(DLS)によって求めた平均粒径を求めたところ6.61 nmであり、同程度の粒子半径を有するPEGの分子量への換算により求めた。

【００５３】

動的光散乱（ＤＬＳ）によるナノシートの大きさ測定

装置：Zetasizer Nano ZSP（商品名、Malvern社製）

測定条件：室温

試料：酸化チタンナノシート重量が０．００８重量％のナノシート分散液を測定に用いた。

【００５４】

透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）によるナノシートの観察

装置：JEM-1230（商品名、JEOL社製）

測定条件：室温、真空環境下

試料：酸化チタンナノシート重量が０．００８重量％のナノシート分散液を測定に用いた。

【００５５】

原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）によるナノシートの観察

装置：CypherS（商品名、Asylum Research社製）

測定条件：室温

【００５６】

ゼータ電位測定

装置：Zetasizer Nano ZSP（商品名、Malvern社製）

測定条件：室温

試料：酸化チタンナノシート重量が０．００８重量％のナノシート分散液を測定に用いた。

【００５７】

Ｘ線小角散乱（ＳＡＸ）

装置：BL45XU in SPring-8

試料：酸化チタンナノシート重量が０．４重量％のナノシート分散液を磁場で配向させた状態でハイドロゲル化によって固定し、測定に用いた。

【００５８】

核磁気共鳴（ＮＭＲ）測定

装置：JNM-ECA-500（商品名、JEOL社製）

測定条件：０℃～９０℃、ナノシートによる重水の四極子相互作用の測定

試料：酸化チタンナノシート重量が０．１~３．０重量%のナノシート分散液の測定に用いた。

装置：ACANCE-500（商品名、Bruker社製）

測定条件：０℃～５０℃、タンパク質の $^{1}H-^{15}N$ のＨＳＱＣ解析

試料：酸化チタンナノシート重量が１．５重量%のナノシートおよび１５ＮでラベルされたＧＢ１タンパク（４ ｍｇ/ｍＬ）分散液の測定に用いた。

装置：ACANCE-600（商品名、Bruker社製）

測定条件：６５℃～８０℃、タンパク質の $^{1}H-^{15}N$ のＨＳＱＣ解析

試料：酸化チタンナノシート重量が１．５重量%のナノシートおよび１５Ｎでラベルされ

たＧＢ１タンパク（４ ｍｇ/ｍＬ）分散液の測定に用いた。

【００５９】

［ナノシートの製造］

参考例、実施例及び比較例で用いたナノシートを表１にまとめた。各例のナノシートの製造方法を以下に示す。

【表１】

参考例		ナノシート	コーティング剤
１	ＴｉＮＳ	ＴｉＮＳ	なし
２	^{small}ＴｉＮＳ	^{small}ＴｉＮＳ	なし
３	ＮｂＮＳ	ＮｂＮＳ	なし
実施例		**ナノシート**	**コーティング剤**
１	ＴｉＮＳ^{Cas}	ＴｉＮＳ	カゼイン（Ｃａｓ）
２	ＴｉＮＳ^{Alb}		アルブミン（Ａｌｂ）
３	ＴｉＮＳ^{Lys}		リゾチーム（Ｌｙｓ）
４	ＴｉＮＳ^{Skim}		スキムミルク（Ｓｋｉｍ）
５	ＴｉＮＳ^{Tan}		タンニン酸（Ｔａｎ）
６	ＴｉＮＳ^{PDDA}		ポリジアリルジメチルアミンクロライド（ＰＤＤＡ）
７	ＴｉＮＳ^{Cho}		コンドロイチン硫酸（Ｃｈｏ）
８	ＮｂＮＳ^{Cas}	ＮｂＮＳ	カゼイン（Ｃａｓ）
９	ＧＯＮＳ^{Cas}	ＧＯＮＳ	カゼイン（Ｃａｓ）
比較例		**ナノシート**	**コーティング剤**
１	ＴｉＮＳ^{Cate}	ＴｉＮＳ	ＰＥＧ修飾 カテコール（Ｃａｔｅ）

【００６０】

［参考例１］ＴｉＮＳの製造

既報(Tanaka T, Ebina Y, Takada K, Kurashima K, Sasaki T.(2003) Chem Mater;15:3564-3568)に従い酸化チタンナノシート（「ＴｉＮＳ」と表記する、組成$Ti_{0.87}O_2$）を製造した。以下特段の記載がない限り、ＴｉＮＳはテトラメチルアンモニウム（ＴＭＡ）溶液（１ｍＭ）に分散させたものを各種測定に用いた。

【００６１】

［参考例２］^{small}ＴｉＮＳの製造

実施例１で製造したＴｉＮＳに対して超音波発生機（商品名ＸＬ－２０００ ＭｉｃｒｏｓｏｎＴＭ、Ｑｓｏｎｉｃａ社製）で超音波処理を３分間行い、酸化チタンナノシート（「^{small}ＴｉＮＳ」と表記する）を製造した。以下特段の記載がない限り、^{small}ＴｉＮＳはテトラメチルアンモニウム（ＴＭＡ）溶液（１ｍＭ）に分散させたものを各種測定に用いた。

【００６２】

［参考例３］ＮｂＮＳの製造

既報(Schaak RE, Mallouk T.(2002) Chem Mater 14:1455-1471)に従い酸化ニオブナノシート（「ＮｂＮＳ」と表記する、組成$Ca_2Nb_3O_{10}$）を製造した。以下特段の記載がない限り、ＮｂＮＳはテトラブチルアンモニウム（ＴＢＡ）溶液（１ｍＭ）に分散させたものを各種測定に用いた。

【００６３】

［実施例１］ＴｉＮＳ^{Cas}の製造

２．０重量％のカゼインを含有するトリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ８．０）を５００

μＬと、０．４重量％の参考例１のＴｉＮＳを含有する水溶液５００μＬとの混合液を作製した。該混合液を６０分間静置した後、該混合液に１０秒間超音波処理を行った。
未吸着のカゼインを除去するため、遠心分離機（商品名CT15RE、HITACHI社製）を用いて遠心操作（１５，０００ｒｐｍ）を４℃で１５分行った。
生じた沈殿物を１ｍＬのトリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ７．７）に再分散させた。この遠心操作と再分散による洗浄操作を３回行い、最終沈殿物を５００μＬのトリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ７．７）に再分散させ、カゼインコートチタンナノシート（ＴｉＮＳ^{Ｃａｓ}）分散液を得た。なお、分散液におけるＴｉＮＳ^{Ｃａｓ}の濃度は、最終沈殿物を分散させる緩衝液量を調節して、各種測定に最適な濃度となるように調整した。また、以下特段の記載がない限り、ＴｉＮＳ^{Ｃａｓ}は再分散時の緩衝液に分散させたものを各種測定に用いた。

【００６４】
［実施例２］ＴｉＮＳ^{Ａｌｂ}の製造
２．０重量％のカゼインの代わりに２．０重量％のアルブミンを用いた以外は実施例１と同様にして、アルブミンコートチタンナノシート（ＴｉＮＳ^{Ａｌｂ}）分散液を得た。

【００６５】
［実施例３］ＴｉＮＳ^{Ｌｙｓ}の製造
２．０重量％のリゾチームを含有するテトラメチルアンモニウム（ＴＭＡ）溶液（２ｍＭ）５００μＬと、０．１重量％の参考例１のＴｉＮＳを含有する水溶液５００μＬとの混合液を作製した。該混合液を６０分間静置した後、実施例１と同様の遠心操作によって未吸着のリゾチームを取り除いた。沈殿物を５００μＬのトリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ２．３）に分散させ、リゾチームコートチタンナノシート（ＴｉＮＳ^{Ｌｙｓ}）分散液を得た。

【００６６】
［実施例４］ＴｉＮＳ^{Ｓｋｉｍ}の製造
２．０重量％のカゼインの代わりに２．０重量％のスキムミルクを用いた以外は実施例１と同様にして、スキムミルクコートチタンナノシート（ＴｉＮＳ^{Ｓｋｉｍ}）分散液を得た。

【００６７】
［実施例５］ＴｉＮＳ^{Ｔａｎ}の製造
０．８５重量％のタンニン酸を含有する水溶液１ｍＬと、０．５重量％の参考例１のＴｉＮＳを含有する水溶液４ｍＬとの混合液を作製した。該混合液を５分間静置した後、実施例１と同様の洗浄操作を再分散水溶液として純水を用いて１０回行うことで、タンニン酸コートチタンナノシート（ＴｉＮＳ^{Ｔａｎ}）分散液を得た。

【００６８】
［実施例６］ＴｉＮＳ^{ＰＤＤＡ}の製造
０．１重量％のポリジアリルジメチルアミンクロライド（ＰＤＤＡ）を含有する水溶液１ｍＬと、０．０２重量％の参考例１のＴｉＮＳを含有する水溶液１ｍＬとの混合液を作製した。該混合液を６０分間静置した後、実施例３と同様の遠心操作によって未吸着のPDDAを取り除くことで、沈殿物を５００μＬのトリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ２．３）に分散させ、ＰＤＤＡコートチタンナノシート（ＴｉＮＳ^{ＰＤＤＡ}）分散液を得た。

【００６９】
［実施例７］ＴｉＮＳ^{Ｃｈｏ}の製造
０．２重量％のコンドロイチン硫酸（Ｃｈｏ）を含有する水溶液１ｍＬと、０．０１重量％の参考例１のＴｉＮＳを含有する水溶液１ｍＬとの混合液を作製した。該混合液を６０分間静置した後、実施例１と同様の洗浄操作を再分散水溶液として純水を用いて３回行うことで、コンドロイチン硫酸コートチタンナノシート（ＴｉＮＳ^{Ｃｈｏ}）分散液を得た。

【００７０】
［実施例１１］ＮｂＮＳ^{Ｃａｓ}の製造

参考例１のＴｉＮＳの代わりに参考例３のＮｂＮＳを用いた以外は実施例１と同様にして、カゼインコートニオブナノシート（ＮｂＮＳ^{Ｃａｓ}）分散液を得た。

【００７１】

［実施例１２］ＧＯＮＳ^{Ｃａｓ}の製造

参考例１のＴｉＮＳの代わりにＧＯＮＳ（商品名Rap eGO(TQ11)、NiSiNa material社製）を用いた以外は実施例１と同様にして、カゼインコート酸化グラフェンナノシート（ＧＯＮＳ^{Ｃａｓ}）分散液を得た。

【００７２】

［比較例１］ＴｉＮＳ^{Ｃａｔｅ}の製造

０．２重量％のＰＥＧ修飾カテコールを含有する水溶液１ｍＬと、０．８重量％の参考例１のＴｉＮＳを含有する水溶液１ｍＬとの混合液を作製した。該混合液を６０分間静置した後、実施例１と同様の洗浄操作を１０回行うことで、ＰＥＧ修飾カテコールコートチタンナノシート（ＴｉＮＳ^{Ｃａｔｅ}）分散液を得た。

【００７３】

［ナノシートの構造評価］

（１）分散液の観察

各例で得られたナノシート分散液（ナノシート濃度０．４重量％）の写真を図４Ａに示す。いずれの実施例のナノシートも液中で分散していることが目視で確認できた。また、ＴｉＮＳの分散液においてはＴｉＮＳのドメイン構造に由来する特徴的なもや状のテクスチャーがコート後の分散液においても確認できた。

【００７４】

次に、ＴｉＮＳ、ＴｉＮＳ^{Ｃａｓ}、ＴｉＮＳ^{Ａｌｂ}、ＴｉＮＳ^{Ｌｙｓ}又はＴｉＮＳ^{Ｃａｔｅ}（ナノシート濃度０．８重量％）５００μＬと塩化ナトリウム水溶液（２０ｍＭ）５００μＬを混合し、ナノシート分散液における塩濃度の影響を調べた。塩化ナトリウム水溶液添加後のナノシート分散液の写真を図４Ｂに示す。

コーティング剤なしのＴｉＮＳでは、ナノシートの沈殿が確認された。一方、コーティング剤でコートされたナノシートでは、塩存在下でもナノシートの分散性を保持できることが確認されたが、比較例１のＴｉＮＳ^{Ｃａｔｅ}は塩存在下で沈殿が生じたことから、本発明においてナノシートとコーティング剤との多点的な相互作用が重要であることが確認された。

本発明のコーティング剤でコートされたナノシートは、塩存在下においても安定に分散していることから、タンパク質の溶液ＮＭＲ測定用配向剤としての利用が期待された。

【００７５】

以上各実施例のナノシートが分散していることを目視で確認した。さらに、各例のナノシートについて、各種構造解析を行った。

【００７６】

（２）動的光散乱（ＤＬＳ）法による大きさ測定

コーティング剤なしのナノシートのＤＬＳによる大きさ分布を図５Ａに示す。ＤＬＳから算出される大きさは、ＴｉＮＳは８２５ｎｍ、^{ｓｍａｌｌ}ＴｉＮＳは２９５ｎｍ、ＮｂＮＳは３２５ｎｍであった。

次に、コーティング剤によるコート前後における大きさ分布を図５Ｂに示す。ＴｉＮＳ及びＮｂＮＳ共にコーティング剤でコートされたナノシートの大きさがわずかに増大していることから、コーティング剤によってナノシートがコートされていることが示唆された。また、コーティング剤なしのナノシートと同様に、コーティング剤でコートされたナノシートも、溶液中で分散していることが確認できた。

【００７７】

（３）透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）によるナノシート分散液の観察

コーティング剤なしのナノシートのＴＥＭ画像を図６Ａに、コーティング剤でコートされたナノシートのＴＥＭ画像を図６Ｂに示す。ＴＥＭ画像中の点線はナノシートの輪郭を強調するために記したものである。

いずれのナノシートも凝集することなく分散しており、大きさもＤＬＳの測定値を支持するものであることが確認できた。

【００７８】

（４）原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）による観察とナノシートの平均厚さの算出

ＴｉＮＳのＡＦＭ画像を図７に示す。ＡＦＭ画像の点線における断面プロファイルから、ナノシートの平均厚さを算出した。コーティング剤によるコート後のナノシートでは、コーティング剤なしのナノシートと比較して厚さが１．０～５．０ｎｍ程増加しており、コーティング剤がＴｉＮＳ表面に吸着していることが強く示唆された。

【００７９】

（５）ゼータ電位測定

以下に示す実施例のナノシート分散液のゼータ電位を測定した。結果を表２に示す。

【００８０】

【表２】

実施例		コーティング剤	分散媒	ゼータ電位（ｍＶ）
1	$TiNS^{Cas}$	カゼイン（Ｃａｓ）	トリス塩酸緩衝液(1mM、pH7.7)	-43.6
3	$TiNS^{Lys}$	リゾチーム（Ｌｙｓ）	トリス塩酸緩衝液(1mM、pH2.3)	+50.1
6	$TiNS^{PDDA}$	ポリジアリルジメチルアミンクロライド（ＰＤＤＡ）	トリス塩酸緩衝液(1mM、pH2.3)	+55.1
7	$TiNS^{Cho}$	コンドロイチン硫酸（Ｃｈｏ）	テトラメチルアンモニウム(1mM)	-70.9

【００８１】

$TiNS^{Cas}$のゼータ電位は－４３．６ｍＶであり、アニオン性タンパク質であるカゼインがナノシート表面に吸着していることが示唆された。一方、$TiNS^{Lys}$のゼータ電位は＋５０．１ｍＶであり、カチオン性タンパク質であるリゾチームがナノシート表面に吸着していることが示唆された。

同様に、ゼータ電位測定結果から、$TiNS^{PDDA}$の表面にはカチオン性高分子であるポリジアリルジメチルアミンクロライドが、$TiNS^{Cho}$の表面にはアニオン性のコンドロイチン硫酸が、それぞれナノシート表面に吸着していることが示唆された。

【００８２】

以上の構造解析により、ナノシート表面にコーティング剤が吸着していることが示唆された。さらに、クマシーブリリアントブルー（ＣＢＢ）を用いてナノシートに対するタンパク質コーティング剤の吸着量を定量的に評価した。

【００８３】

［コーティング剤吸着の評価］

（６）コーティング剤吸着確認

コーティング剤としてタンパク質を用いたナノシートにおいて、コートするタンパク質の量を変化させ（０～２．０ｍｇ／ｍＬ）ナノシートを製造し、コート後のタンパク質の吸着量をＣＢＢ染色で定量した。その結果を図８に示す。

いずれのタンパク質を用いた場合もナノシート上への吸着量が飽和しており、シートの全面がタンパク質でコーティングされていることが支持された。

なお、上述した実施例のナノシートの製造方法において、本実験で確認された飽和吸着量以上のコーティング剤を用いてナノシートの製造を行った。

【００８４】

また、$TiNS^{Skim}$及び$GONS^{Cas}$に対して同様にＣＢＢ染色を行い、タンパク質吸着の確認を行った。その結果を図９に示す。いずれのナノシートにおいても、ＣＢＢのタンパク質への吸着に由来する５８５ｎｍ付近の吸収ピークが増加しており、ＴｉＮ

Ｓ及びＧＯＮＳへタンパク質が吸着していることが確認できた。

【００８５】

さらに、経時で安定してタンパク質がナノシートに吸着していることを確認するため、以下の方法によりナノシートへのタンパク質吸着量の経時変化を確認した。

まず、ＴｉＮＳ^{Ｃａｓ}（０．７重量％）をトリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ７．７）に分散させ、該分散液を室温下静置した。ナノシートの製造から０．５、１、２、５日間静置した後の各分散液に対して、遠心分離機（商品名ＣＴ１５ＲＥ、ＨＩＴＡＣＨＩ社製）を用いて遠心操作（１５，０００ｒｐｍ）を４℃で１５分行った。上澄み液に含まれるタンパク質をＣＢＢ染色によって定量した。

ナノシート製造直後の上澄み液に含まれるタンパク質量から算出したナノシート上から乖離したタンパク質量を０％として、０．５、１、２、５日間静置した後のナノシート上から乖離したタンパク質の割合を算出し、１００％からその割合を引くことでナノシート上に吸着したタンパク質の量を算出した。

同様に、ＴｉＮＳ^{Ｌｙｓ}（０．９重量％）のトリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ２．３）についても、ナノシート上に吸着したタンパク質の割合を算出した。結果を図１０に示す。

Ｃａｓ及びＬｙｓは、いずれも５日後にもほとんどＴｉＮＳ上から脱着しないことが確認された。

【００８６】

また、モデル化合物として蛍光ラベルしたタンパク質を用い、ナノシート分散液と混合して静置した後、該ナノシート分散液を共焦点レーザー顕微鏡（ＣＬＳＭ）により観察し、ナノシートとモデル化合物との相互作用を確認した。

モデル化合物としては、アニオン性タンパク質として蛍光ラベルしたアルブミン（^{ＦＬ}Ａｌｂ）を、カチオン性タンパク質として蛍光ラベルしたリボヌクレアーゼA（^{Ｆｌ}ＲＮ－Ａ）を用いた。

^{ＦＬ}Ａｌｂ（０．５ｍｇ／ｍＬ）をトリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ７．７）中のＴｉＮＳ（ナノシート濃度０．４重量％）と混合して、２４時間後のナノシート分散液のＣＬＳＭ画像を図１１（Ａ）に示す。また、ナノシートとしてトリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ７．７）中のＴｉＮＳ^{Ｃａｓ}を用いた場合の結果を図１１（Ｂ）、トリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ２．３）中のＴｉＮＳ^{Ｌｙｓ}を用いた場合の結果を図１１（Ｃ）に示す。

同様に、^{Ｆｌ}ＲＮ－Ａ（０．５ｍｇ／ｍＬ）を用いて、ＴｉＮＳ、ＴｉＮＳ^{Ｃａｓ}又はＴｉＮＳ^{Ｌｙｓ}と混合した場合の結果をそれぞれ図１１（Ｄ）～（Ｆ）に示す。

図１１（Ｂ）及び（Ｆ）において蛍光強度が弱いことから、アニオン性の^{ＦＬ}Ａｌｂは、マイナス電荷を有するＴｉＮＳ^{Ｃａｓ}への吸着が大きく抑制されており、カチオン性の^{Ｆｌ}ＲＮ－Ａはプラス電荷を有するＴｉＮＳ^{Ｌｙｓ}への吸着が大きく抑制されていることが確認できた。

ＮＭＲ測定対象分子がナノシートと強く相互作用することは、その配向性の妨げになるため、好ましくない。このため、ＮＭＲ測定対象分子とナノシートの選定にあたって、本結果の図１１（Ｂ）及び（Ｆ）に示すような弱い蛍光強度が確認されるようなものの組み合わせとすることが好ましい。

【００８７】

［磁場配向性の評価］

（７）Ｘ線小角散乱（ＳＡＸ）

コーティング剤でコートされたナノシートの磁場配向性を調べるため、ＴｉＮＳ^{Ｃａｓ}、ＴｉＮＳ^{Ａｌｂ}及びＴｉＮＳ^{Ｌｙｓ}（それぞれ０．４重量％）をジメチルアクリルアミドゲルに包埋した後にＳＡＸ解析を行った。

【００８８】

図１２（Ａ）は、本測定の概略図を表すものであり、図中の記号Ｂは磁場ベクトルを表す。図１２（Ｂ）～（Ｄ）に示したＳＡＸ解析結果より、タンパク質でコートされたナノシートもコーティング剤なしのＴｉＮＳと同様に磁場に対して垂直に配向していることが

確認できた。

【００８９】

（８）D_2O四極子相互作用の分裂ピークによる配向性評価

本発明のナノシートの磁場配向性を評価するにあたり、まず低分子である水を用いて、水の四極子分裂の分裂ピーク幅により評価した。このピーク幅が大きいほど、水分子が配向しており、配向性が高いことを表す。

【００９０】

まず、コーティング剤なしのナノシートについて、測定温度を２４℃に一定に保ち測定試料中のナノシート濃度を変えてナノシート濃度依存性を調べた。また、測定試料中のナノシート濃度を一定に保ち測定温度を変えて測定し、温度依存性を調べた。

各ナノシートの表３に示す溶液におけるD_2O四極子相互作用の分裂ピークを図１３に示す。

【００９１】

【表３】

参考例	ナノシート	溶媒
１	ＴｉＮＳ	テトラメチルアンモニウム（ＴＭＡ）（１ｍＭ）
２	^{small}ＴｉＮＳ	テトラメチルアンモニウム（ＴＭＡ）（１ｍＭ）
３	ＮｂＮＳ	テトラブチルアンモニウム（ＴＢＡ）（１ｍＭ）

【００９２】

既報のバイセル（Shapiro RA, Brindley AJ, Martin RW.(2010) J Am Chem Soc 132:11406-11407）は測定温度２２℃の条件下でピークが分裂していないのに対し、本願発明のナノシートでは分裂ピークが観測され、磁場中でナノシート及び水分子が配向していることがわかった。

また、ナノシート濃度の上昇に伴いD_2O四極子相互作用の分裂ピーク幅が大きいことから、濃度依存的に配向性が高くなることがわかった。さらに、測定温度によらず０℃～９０℃まで広い温度範囲でD_2O四極子相互作用の分裂ピークがみられたことから、温度に対して安定的に配向性を有することがわかった。

【００９３】

次に、コーティング剤でコートされたナノシートについて、各ナノシートの表４に示す溶液におけるD_2O四極子相互作用の分裂ピークを図１４に示す。

【００９４】

【表４】

実施例	ナノシート	溶媒
１	ＴｉＮＳ^{Cas}	トリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ７．７）
３	ＴｉＮＳ^{Lys}	トリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ２．３）
５	ＴｉＮＳ^{Tan}	水（ｐＨ７．０）
６	ＴｉＮＳ^{PDDA}	トリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ２．３）
７	ＴｉＮＳ^{Cho}	水（ｐＨ７．０）
９	ＧＯＮＳ^{Cas}	トリス塩酸緩衝液（１ｍＭ、ｐＨ７．７）

【００９５】

コーティング剤なしのナノシート同様に分裂ピークが観測され、磁場中でナノシート及び水分子が配向していることがわかった。

【００９６】

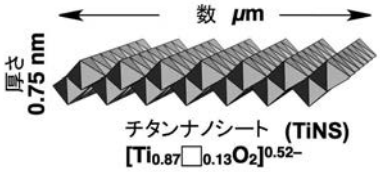
（９）グルコースの配向性評価

続いて、ＴｉＮＳ又はＮｂＮＳを用いて、^{13}Ｃラベルしたグルコースの^{13}Ｃ－ＮＭＲ測定を行った。

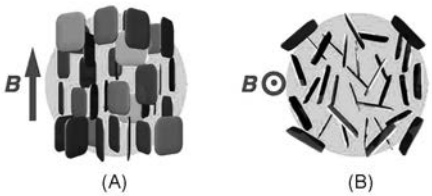
ＮＭＲ測定試料は、ＴｉＮＳ（１．５重量％）のＴＭＡ（１ｍＭ）溶液又はＮｂＮＳ（４．０重量％）のＴＢＡ（１ｍＭ）溶液に、３重量％のグルコースを添加して得た。結果

を図１５に示す。
図１５（Ａ）はナノシートを添加せずに^{13}Ｃラベルしたグルコースの測定結果、（Ｂ）はＴｉＮＳを添加した測定結果、（Ｃ）はＮｂＮＳを添加した結果測定である。^{13}Ｃのカップリングシフトから、ＴｉＮＳ及びＮｂＮＳのいずれを添加した場合も、ナノシートを添加しなかった場合に比べてシフトしており、βグルコース分子が配向していることが確認できた。
【００９７】
（１０）タンパク質の配向性評価
ＴｉＮＳ^{Cas}又はＮｂＮＳ^{Cas}を用いて、^{15}Ｎラベルしたプロテイン　Ｇ　β１ドメイン（^{15}Ｎ－ＧＢ１）のＮＭＲ測定を行った。
ＮＭＲ測定試料は、ＴｉＮＳ^{Cas}（２．５重量％）又はＮｂＮＳ^{Cas}（４．１重量％）のトリス塩酸緩衝液（１０ｍＭ、ｐＨ６．８）（D_2O＝１０％）に、^{15}Ｎ－ＧＢ１（４．０ｍｇ／ｍＬ）を添加して得た。ＴｉＮＳ^{Cas}は、５～８０℃の種々の測定温度で測定を行った。ＮｂＮＳ^{Cas}は３５℃で測定を行った。
【００９８】
図１６にＩＰＡＰ－ＨＳＱＣスペクトルを、図１７にＩＰＡＰ－ＨＳＱＣスペクトル解析から算出したアミノ酸骨格に由来する^{1}Ｈ－^{15}Ｎ結合の残余双極子結合（ＲＤＣ）一覧を示す。
ナノシートの存在下でＩＰＡＰ－ＨＳＱＣスペクトル及びＲＤＣが観察されることが確認された。
【００９９】
さらに、ＴｉＮＳ^{Cas}の実測されたＲＤＣと既報の構造から計算されたＲＤＣデータの相関関係を各測定温度（５～６５℃）についてまとめたグラフを図１８に示す。
【０１００】
３５℃と５０℃において既報であるＧＢ１（蛋白質構造データバンクＰＤＢ：２ＰＬＰ）と高い相関が見られたのに対し、５、２０、６５℃においては低い相関を示し、ＧＢ１の構造変化が起こっていることがわかった。
本発明のナノシートは、従来の配向剤に比べて、広い温度範囲でタンパク質のＮＭＲ測定用配向剤として機能することが明らかとなった。
【０１０１】
次に、ＴｉＮＳ^{Cas}（２．５重量％）と^{15}Ｎ－ＧＢ１（４ｍｇ／ｍＬ）をトリス塩酸緩衝液（１０ｍＭ、ｐＨ６．８）中で２時間混合し、遠心操作（１５,０００ｒｐｍ）を行い、上澄み液を得た。
同様に、ＴｉＮＳ（１．５重量％）と^{15}Ｎ－ＧＢ１（４ｍｇ／ｍｌ）をトリス塩酸緩衝液（１０ｍＭ、ｐＨ６．８）中で２時間混合し、遠心操作を行い、上澄み液を得た。
各上澄み液をＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）に供した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を図１９に示す。レーン１がタンパク質マーカーであり、レーン２が^{15}Ｎ－ＧＢ１であり、レーン３がＴｉＮＳ^{Cas}の上澄み液であり、レーン４がＴｉＮＳの上澄み液である。
【０１０２】
ＴｉＮＳ^{Cas}の上澄み液からは^{15}Ｎ－ＧＢ１に由来するバンドが検出され、^{15}Ｎ－ＧＢ１が回収可能であることが確認された。
本発明のコーティング剤ナノシートは、従来の配向剤では回収不可能であったＮＭＲ測定対象のタンパク質を簡便な遠心操作により回収でき、配向剤であるナノシート自体も再利用可能であることがわかった。

【図１】



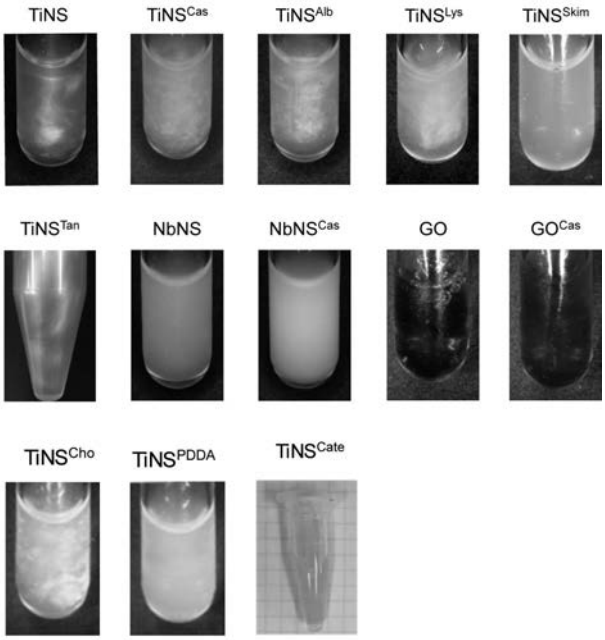
【図２】



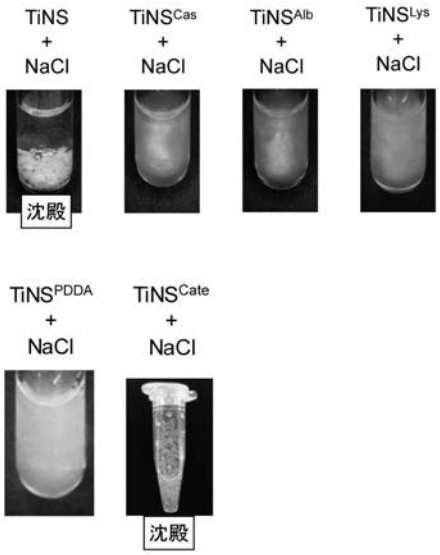
【図３】



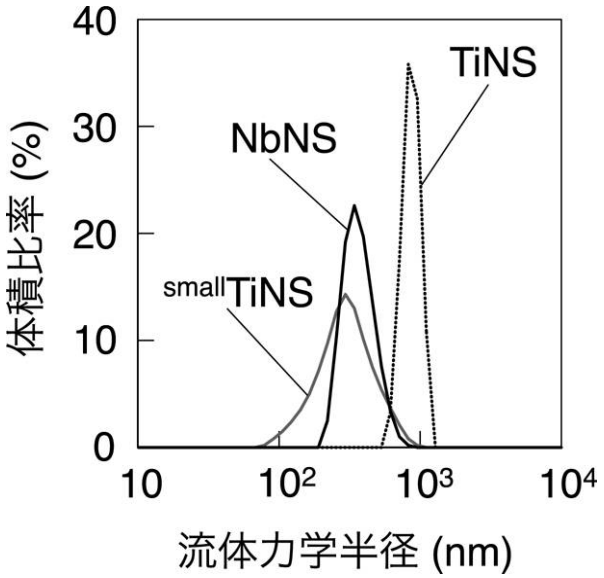
【図４Ａ】



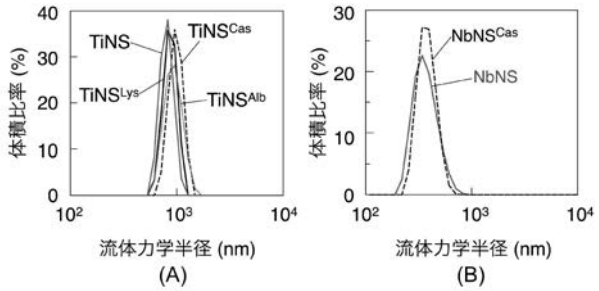
【図４Ｂ】



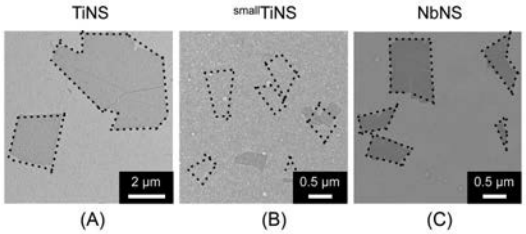
【図５Ａ】



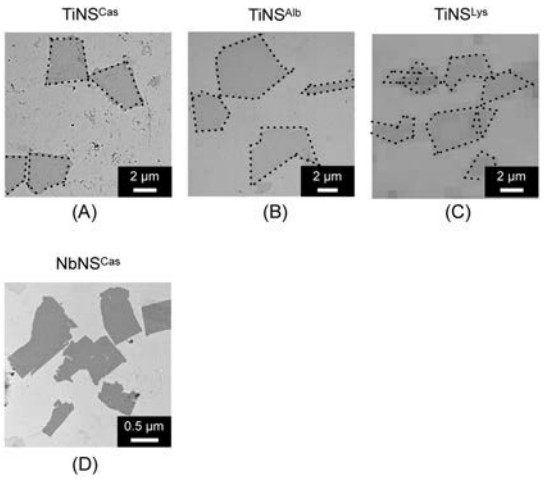
【図５Ｂ】



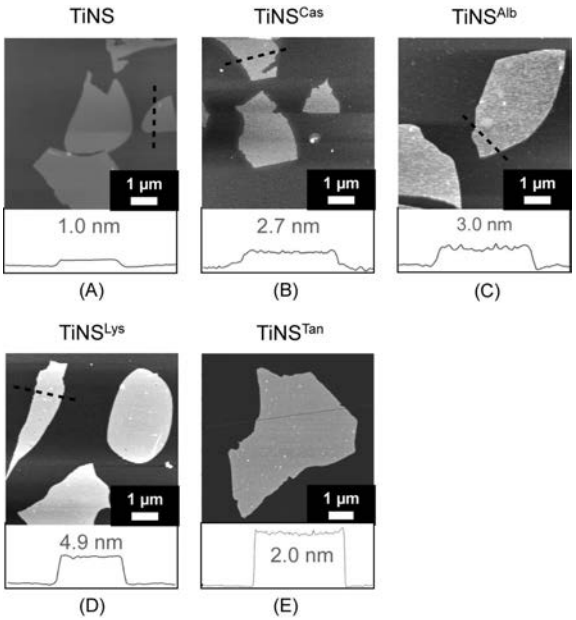
【図６Ａ】



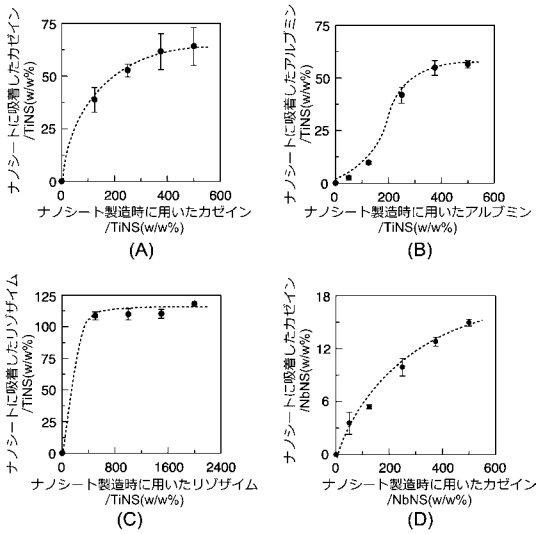
【図６Ｂ】



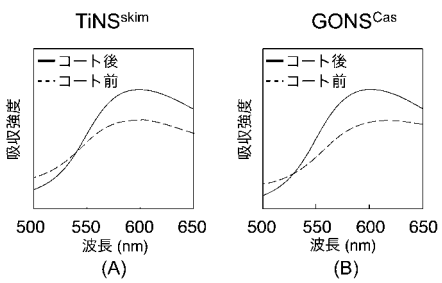
【図７】



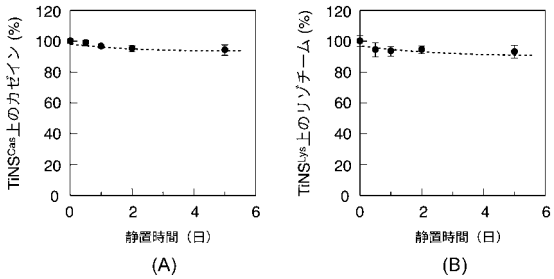
【図８】



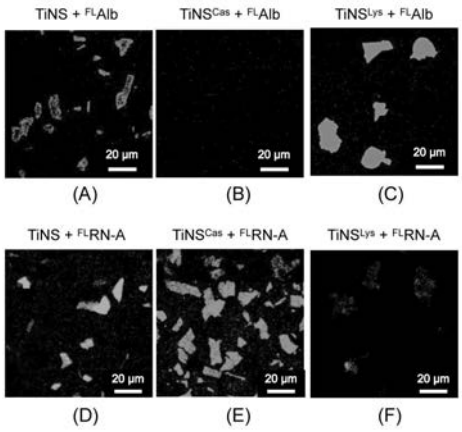
【図９】



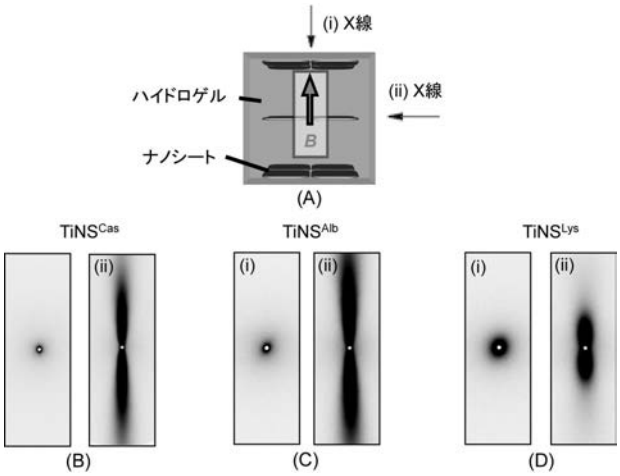
【図１０】



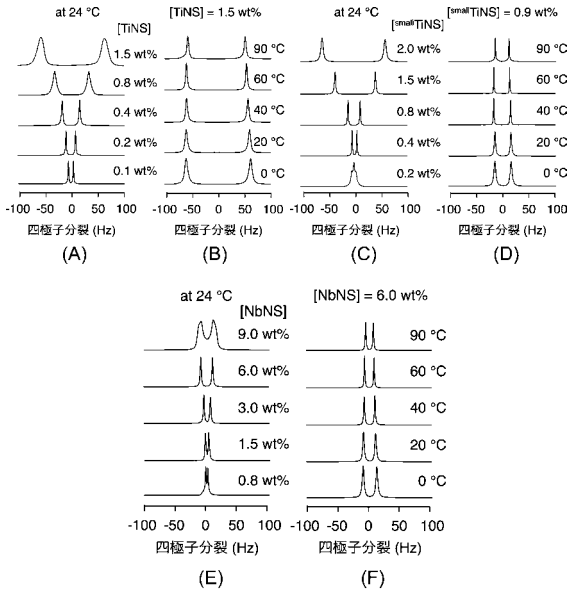
【図１１】



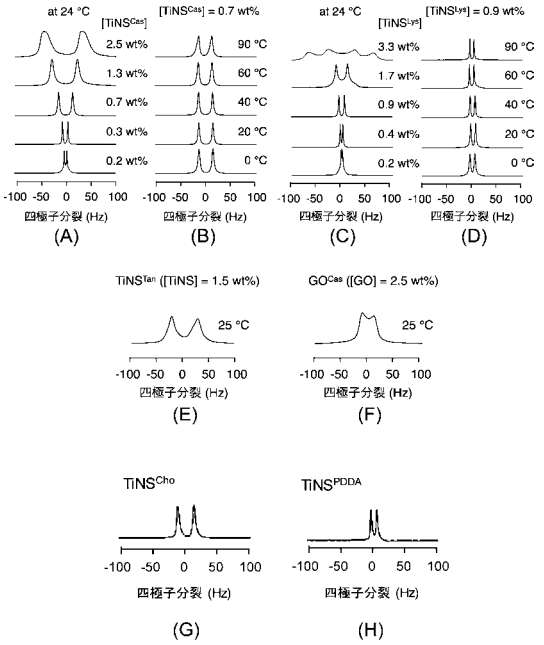
【図１２】



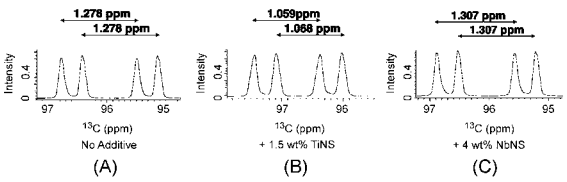
【図１３】



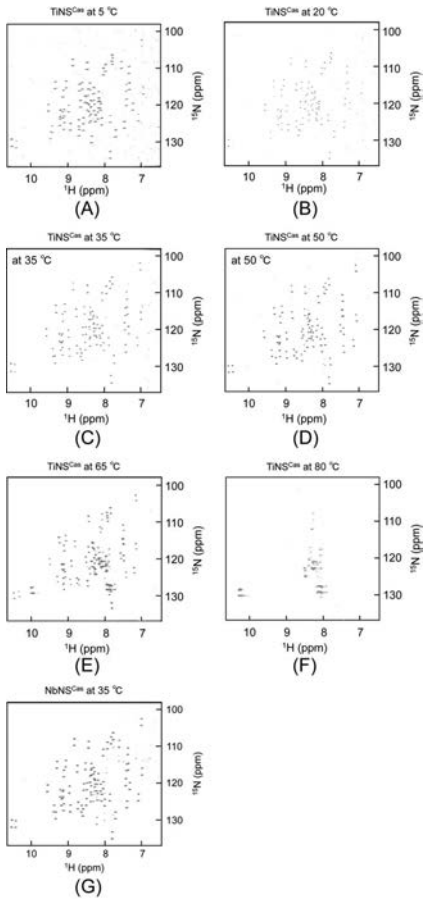
【図１４】



【図１５】



【図１６】



【図１７】

TiNS^{Cas} at 5 °C

Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)
S1	—	A20	0.62	V39	3.60
T2	—	V21	-0.56	D40	3.60
Y3	-2.53	D22	-1.77	G41	1.92
K4	-3.60	A23	-2.44	E42	-1.18
L5	-0.04	A24	7.24	W43	-2.43
I6	-2.19	T25	-4.06	T44	-3.05
L7	-0.91	A26	-5.82	Y45	-1.77
N8	-0.50	E27	-2.29	D46	-3.44
G9	-0.46	K28	2.46	D47	0.75
K10	0.35	V29	-0.82	A48	-0.36
T11	1.31	F30	-1.93	T49	2.33
L12	-1.27	K31	2.07	K50	-3.10
K13	-2.27	Q32	2.13	T51	-2.33
G14	-2.73	Y33	-0.56	F52	2.43
E15	—	A34	0.71	T53	-2.09
T16	-2.33	N35	-2.33	V54	-2.22
T17	-3.15	D36	1.77	T55	0.20
T18	-3.55	N37	-0.10	E56	0.77
E19	-3.49	G38	1.72		

(A)

TiNS^{Cas} at 20 °C

Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)
S1	—	A20	-1.98	V39	1.90
T2	-4.83	V21	-2.13	D40	2.86
Y3	3.18	D22	-0.46	G41	2.08
K4	-2.38	A23	-2.06	E42	1.51
L5	-5.33	A24	-1.07	W43	0.45
I6	0.03	T25	-0.77	T44	-1.61
L7	-0.25	A26	-3.29	Y45	-2.09
N8	-0.07	E27	-1.45	D46	-1.76
G9	-1.57	K28	-1.17	D47	-1.15
K10	3.28	V29	0.14	A48	-1.51
T11	1.54	F30	-4.55	T49	—
L12	-0.84	K31	-0.05	K50	-1.14
K13	-1.83	Q32	0.20	T51	-1.63
G14	-1.56	Y33	-0.18	F52	5.39
E15	—	A34	-0.29	T53	-0.92
T16	-1.91	N35	0.66	V54	-1.75
T17	-2.39	D36	3.06	T55	-1.53
T18	-3.35	N37	6.05	E56	1.54
E19	-0.05	G38	1.89		

(B)

TiNS^{Cas} at 35 °C

Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)
S1	—	A20	-2.81	V39	4.33
T2	—	V21	-2.21	D40	3.16
Y3	-3.64	D22	-0.04	G41	3.37
K4	-3.09	A23	-0.5	E42	1.96
L5	-2.21	A24	0.55	W43	-2.11
I6	-2.05	T25	0	T44	-2.04
L7	-1.24	A26	-3.43	Y45	-2.13
N8	1.06	E27	-1.09	D46	-4.03
G9	-1.67	K28	1.77	D47	-1.97
K10	0.68	V29	-0.19	A48	0.40
T11	2.01	F30	0.55	T49	-2.11
L12	-1.56	K31	-1.20	K50	-3.46
K13	-2.67	Q32	1.79	T51	-4.24
G14	-2.61	Y33	-0.32	F52	-5.01
E15	-2.57	A34	-0.13	T53	-1.04
T16	-3.26	N35	0.82	V54	-2.01
T17	-3.73	D36	2.08	T55	0.06
T18	-3.82	N37	-1.08	E56	-0.50
E19	-4.86	G38	3.28		

(C)

TiNS^{Cas} at 50 °C

Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)
S1	—	A20	-1.88	V39	2.39
T2	-2.39	V21	0.12	D40	3.35
Y3	-1.57	D22	-2.52	G41	3.07
K4	-3.16	A23	2.84	E42	—
L5	-2.10	A24	0.64	W43	-0.21
I6	-1.64	T25	-0.42	T44	-1.60
L7	-0.48	A26	-2.20	Y45	-2.10
N8	0.84	E27	-1.03	D46	-2.88
G9	-1.30	K28	1.46	D47	-1.40
K10	0.91	V29	-1.27	A48	0.62
T11	3.86	F30	-1.81	T49	-0.58
L12	-1.31	K31	1.34	K50	-3.00
K13	-1.49	Q32	1.50	T51	-3.48
G14	-2.25	Y33	-0.09	F52	-3.93
E15	-2.61	A34	0.34	T53	-1.48
T16	-3.28	N35	1.81	V54	-0.41
T17	-3.20	D36	1.35	T55	0.22
T18	-3.58	N37	-0.79	E56	-0.11
E19	-2.81	G38	3.71		

(D)

TiNS^{Cas} at 65 °C

Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)
S1	—	A20	0.08	V39	-0.61
T2	0.32	V21	—	D40	-4.14
Y3	0.57	D22	1.22	G41	1.23
K4	1.90	A23	3.67	E42	1.97
L5	3.66	A24	-0.38	W43	4.12
I6	2.90	T25	2.51	T44	—
L7	-0.08	A26	-0.24	Y45	1.34
N8	0.93	E27	—	D46	4.60
G9	1.11	K28	-5.78	D47	0.38
K10	1.27	V29	-0.55	A48	2.08
T11	—	F30	0.29	T49	-3.14
L12	-0.22	K31	3.55	K50	-0.53
K13	-0.27	Q32	0.22	T51	1.97
G14	4.76	Y33	2.57	F52	2.45
E15	-3.25	A34	-0.41	T53	1.62
T16	4.38	N35	-0.58	V54	-1.54
T17	0.59	D36	—	T55	-0.29
T18	0.14	N37	0.37	E56	-0.62
E19	0.23	G38	-1.13		

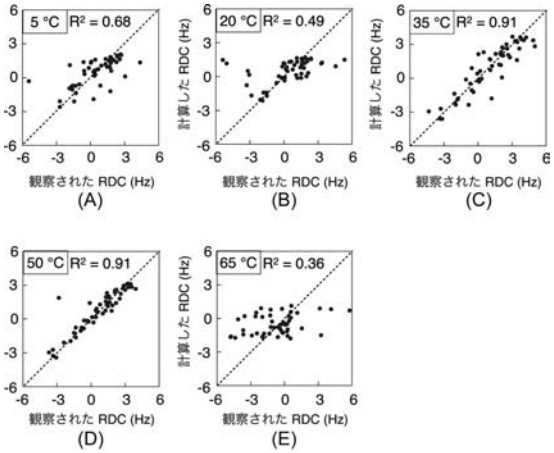
(E)

NbNS^{Cas} at 35 °C

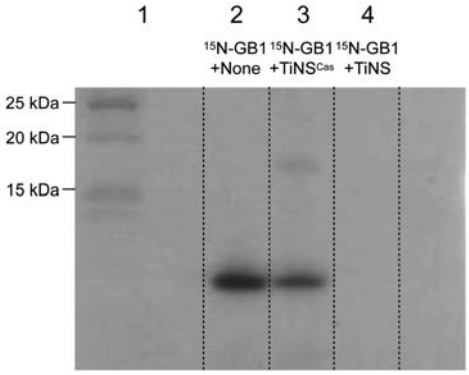
Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)
S1	—	A20	1.10	V39	-3.53
T2	0.32	V21	1.71	D40	-2.83
Y3	2.08	D22	1.95	G41	-2.19
K4	2.67	A23	1.86	E42	-1.43
L5	2.04	A24	-0.75	W43	0.33
I6	1.53	T25	0.04	T44	1.78
L7	1.22	A26	1.56	Y45	2.49
N8	0.89	E27	0.74	D46	2.53
G9	0.53	K28	-1.94	D47	1.21
K10	0.06	V29	0.55	A48	-1.44
T11	-1.61	F30	-0.14	T49	-2.91
L12	1.06	K31	-2.22	K50	2.16
K13	1.61	Q32	-1.96	T51	2.60
G14	1.78	Y33	-2.00	F52	1.88
E15	2.02	A34	0.01	T53	1.44
T16	2.52	N35	-1.99	V54	0.61
T17	2.55	D36	-1.84	T55	0.57
T18	2.59	N37	1.39	E56	0.78
E19	2.54	G38	-2.20		

(F)

【図１８】



【図１９】



フロントページの続き

(72)発明者　石田康博
埼玉県和光市広沢２番１号　国立研究開発法人理化学研究所内
(72)発明者　上野堅登
埼玉県和光市広沢２番１号　国立研究開発法人理化学研究所内
(72)発明者　孫志方
埼玉県和光市広沢２番１号　国立研究開発法人理化学研究所内
(72)発明者　リチャオチュ
米国マサチューセッツ州ケンブリッジ　マサチューセッツ通り７７　マサチューセッツ工科大学
(72)発明者　山口芳樹
埼玉県和光市広沢２番１号　国立研究開発法人理化学研究所内
(72)発明者　佐々木高義
茨城県つくば市千現一丁目２番地１　国立研究開発法人物質・材料研究機構内
(72)発明者　海老名保男
茨城県つくば市千現一丁目２番地１　国立研究開発法人物質・材料研究機構内
(72)発明者　相田卓三
埼玉県和光市広沢２番１号　国立研究開発法人理化学研究所内

Ｆターム(参考)　4G047　CA02　CB04　CB08　CC03　CD02
4G048　AA02　AA08　AB02　AB04　AC08　AD02
4G146　AA29　AB07　AD10　BA04　BA44　BB15　CB10