

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2018年11月29日(29.11.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/216689 A1

- (51) 国際特許分類:  
*G01N 24/00* (2006.01) *C01G 23/04* (2006.01)  
*C01B 32/198* (2017.01) *C01G 33/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/019655
- (22) 国際出願日: 2018年5月22日(22.05.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2017-105022 2017年5月26日(26.05.2017) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 国立研究開発法人物質・材料研究機構(NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目 2 番地 1 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者: 内田 紀之 (UCHIDA, Noriyuki); 〒3510198 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 Saitama (JP). 石田 康博 (ISHIDA, Yasuhiro); 〒3510198 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 Saitama (JP). 上野 堅登 (UENO, Kento); 〒3510198 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 Saitama (JP). 孫志方 (SUN, Zhifang); 〒3510198 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 Saitama (JP). リチャオチュ (LI, Qiaochu); 02139 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内 Massachusetts (US). 山口 芳樹 (YAMAGUCHI, Yoshiki); 〒3510198 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 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 牛木 護 (USHIKI Mamoru); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目 1 4 番 1 号 郵政福祉琴平ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,

(54) Title: NANOSHEET-CONTAINING ORIENTATION AGENT FOR NMR MEASUREMENT

(54) 発明の名称: ナノシートを含むNMR測定用配向剤

(57) Abstract: Provided is a nanosheet-containing orientation agent for NMR measurement that can be easily prepared, has excellent handling properties, economic advantages and high versatility, and ensures a stable magnetic field orientation. In the orientation agent for NMR measurement, a nanosheet is coated with a compound which carries at least one kind of functional group selected from among a hydroxy group, an amino group, an amide group, a carbonyl group, a carboxyl group, a sulfo group, a phosphate group, an imidazole group and a guanidine group at a ratio of 35 or more functional groups per molecule and has a molecular weight of 1,500 or more.

(57) 要約: 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。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。



LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,  
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

## 明 細 書

発明の名称： ナノシートを含むNMR測定用配向剤

### 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、p f 1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ため、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（p f 1）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>

ナノシートと、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以上の化合物と、を含み、前記ナノシートが前記化合物で被覆されていることを特徴とする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]図1は酸化チタンナノシートの模式図である。

[図2]図2Aおよび図2B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。

[図3]図3Aおよび図3Bは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4]図4はナノシート分散液の写真である。

[図5]図5は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6]図6は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7]図7Aおよび図7Bは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8]図8A~図8Cは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9]図9A~図9Dは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10]図10A~図10Eはナノシートの原子間力顕微鏡(AFM)画像である。

[図11]図11A~図11Dは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12]図12Aおよび図12Bは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13]図13Aおよび図13Bはタンパク質吸着量の経時変化を表すグラフである。

[図14]図14A～図14Fは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15]図15A～図15Dはナノシートの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16]図16A～図16Fはコーティング剤なしのナノシート分散液中におけるD<sub>2</sub>O四極子相互作用の分裂ピークである。

[図17]図17A～図17Hは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<sub>2</sub>O四極子相互作用の分裂ピークである。

[図18]図18A～図18Cは<sup>13</sup>Cラベルしたグルコースの<sup>13</sup>C-NMR測定結果である。

[図19]図19A～図19GはT i N S<sup>Cas</sup>及びN b N S<sup>Cas</sup>のIPAP-HSQCスペクトルである。

[図20]図20A～図20FはT i N S<sup>Cas</sup>及びN b N S<sup>Cas</sup>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21]図21A～図21EはT i N S<sup>Cas</sup>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22]図22はT i N S<sup>Cas</sup>及びT i N S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0.5 nm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0.5～3.0 nmが好ましく、1.0～2.5 nm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10 nm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100 nm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100 μm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<sup>3</sup>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<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)；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；ペプチドのナノシート；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)、 $[(Al_2)(Si_2Al_2)O_{10}(OH)_2]Ca$ 、 $[(Al_2)(Si_3Al)O_{10}(OH)_2]K$ 、 $[Al_4Si_4O_{10}](OH)_8$ 、 $Al_4Si_4O_{10}(OH)_8 \cdot 4H_2O$ 、 $(Mg^{2+}_x, Mg^{3+}_x(OH)_2 (A^{n-})_{x/n} \cdot yH_2O)$  (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  $Ti_{0.87}\square_{0.13}O_2$  ( $\square$ : 空孔) の結晶構造を有する酸化チタンは、厚さ約 0.75 nm、横幅が数  $\mu m$  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2A～図2B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。図2Aは側面図、図2B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3A～図3Bは磁場配向している酸化ニオブシートの概略図である。図3Aは側面図、図3B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

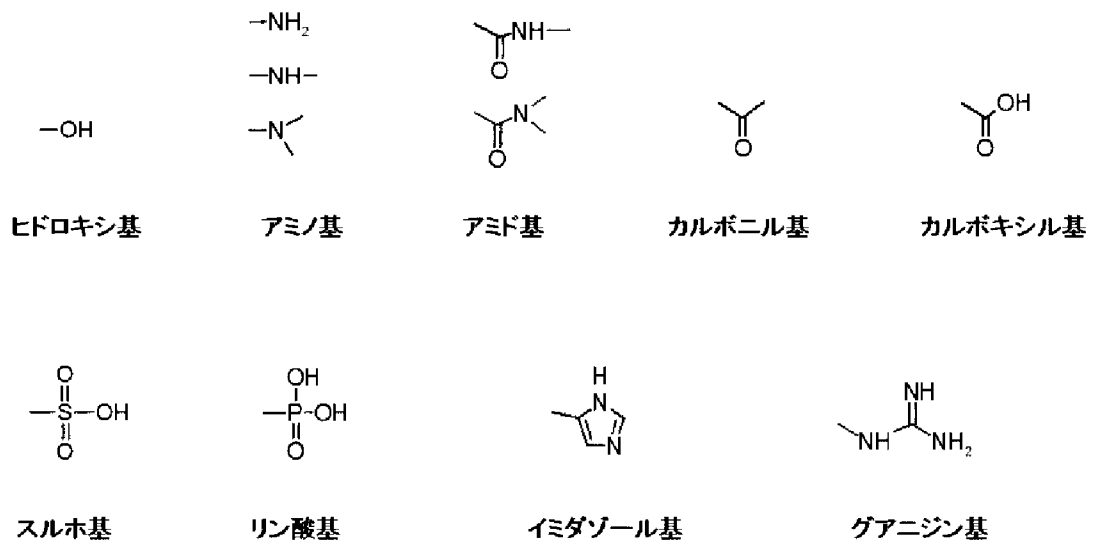
酸化グラフェンナノシートは、酸化ニオブナノシートと同様に外部磁場の方向がシートの接線方向に一致するように配向するため、シートの接線方向となるナノシートの配向軸を中心に回転自在となっている。

[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、ストレプトアビチン、アビチン、シャペロニン、インスリン、アミロイド $\beta$ 、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、アルビノガラクトン、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て行ってもよい。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つてのみ限定される。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）

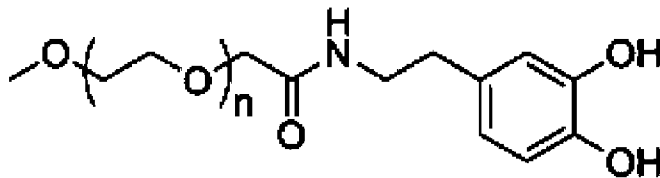
PEG修飾カテコール：以下の方法により合成した。

[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 151:1081-92）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 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 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 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 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	T i N S	T i N S	なし
2	<small>s m a l l</small> T i N S	<small>s m a l l</small> T i N S	なし
3	N b N S	N b N S	なし
実施例		ナノシート	コーティング剤
1	T i N S <sup>C a s</sup>	T i N S	カゼイン (C a s)
2	T i N S <sup>A l b</sup>		アルブミン (A l b)
3	T i N S <sup>L y s</sup>		リゾチーム (L y s)
4	T i N S <sup>S k i m</sup>		スキムミルク (S k i m)
5	T i N S <sup>T a n</sup>		タンニン酸 (T a n)
6	T i N S <sup>P D D A</sup>		ポリジアリルジメチルアミンクロライド (P D D A)
7	T i N S <sup>C h o</sup>		コンドロイチン硫酸 (C h o)
8	N b N S <sup>C a s</sup>	N b N S	カゼイン (C a s)
9	G O N S <sup>C a s</sup>	G O N S	カゼイン (C a s)
比較例		ナノシート	コーティング剤
1	T i N S <sup>C a t e</sup>	T i N S	PEG修飾 カテコール (C a t e)

[0060] [参考例1] T i N S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(「T i N S」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、T i N S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] s m a l l T i N Sの製造

実施例1で製造したT i N S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(「s m a l l T i N S」と表記する)を製造した。以下特段の記載がない限り、s m a l l T i N S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] N b N S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 $\text{Ca}_2\text{Nb}_3\text{O}_{10}$ )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(1 mM)に分散させたものを各種測定に用いた。

[0063] [実施例1] TiNS<sup>Cas</sup>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(1 mM、pH 8.0)を500  $\mu\text{L}$ と、0.4重量%の参考例1のTiNSを含有する水溶液500  $\mu\text{L}$ 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(15,000 rpm)を4℃で15分を行った。

生じた沈殿物を1 mLのトリス塩酸緩衝液(1 mM、pH 7.7)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500  $\mu\text{L}$ のトリス塩酸緩衝液(1 mM、pH 7.7)に再分散させ、カゼインコートチタンナノシート(TiNS<sup>Cas</sup>)分散液を得た。なお、分散液におけるTiNS<sup>Cas</sup>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<sup>Cas</sup>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<sup>Alb</sup>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<sup>Alb</sup>)分散液を得た。

[0065] [実施例3] TiNS<sup>Lys</sup>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(2 mM)500  $\mu\text{L}$ と、0.1重量%の参考例1のTiNSを含有する水溶液500  $\mu\text{L}$ 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500  $\mu\text{L}$ のトリス塩酸緩衝液(1 mM、pH 2.3)に分散させ

、リゾチームコートチタンナノシート (T i N S<sup>Lys</sup>) 分散液を得た。

[0066] [実施例4] T i N S<sup>Skim</sup>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 (T i N S<sup>Skim</sup>) 分散液を得た。

[0067] [実施例5] T i N S<sup>Tan</sup>の製造

0.85重量%のタンニン酸を含有する水溶液1 mLと、0.5重量%の参考例1のT i N Sを含有する水溶液4 mL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 (T i N S<sup>Tan</sup>) 分散液を得た。

[0068] [実施例6] T i N S<sup>PDDA</sup>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1 mLと、0.02重量%の参考例1のT i N Sを含有する水溶液1 mL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500  $\mu$ Lのトリス塩酸緩衝液 (1 mM、pH 2.3) に分散させ、PDDAコートチタンナノシート (T i N S<sup>PDDA</sup>) 分散液を得た。

[0069] [実施例7] T i N S<sup>Cho</sup>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1 mLと、0.01重量%の参考例1のT i N Sを含有する水溶液1 mL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 (T i N S<sup>Cho</sup>) 分散液を得た。

[0070] [実施例8] N b N S<sup>Cas</sup>の製造

参考例1のT i N Sの代わりに参考例3のN b N S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 (N b N S<sup>Cas</sup>) 分散液を得た。

[0071] [実施例9] GONS<sup>Cas</sup>の製造

参考例1のTiNSの代わりにGONS（商品名Rap eG0(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<sup>Cas</sup>）分散液を得た。

[0072] [比較例1] TiNS<sup>Cate</sup>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<sup>Cate</sup>）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4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<sup>Cas</sup>、TiNS<sup>Alb</sup>、TiNS<sup>Lys</sup>又はTiNS<sup>Cate</sup>（ナノシート濃度0.8重量%）500 $\mu$ Lと塩化ナトリウム水溶液（20mM）500 $\mu$ L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5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<sup>Cate</sup>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

で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6に示す。DLSから算出される大きさは、TiNSは825nm、<sup>small</sup>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7A~図7B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8A~図8C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9A~図9D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10A~図10E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	T i N S <sup>Cas</sup>	カゼイン (C a s)	トリス塩酸緩衝液 (1mM, pH7.7)	-43.6
3	T i N S <sup>Lys</sup>	リゾチーム (L y s)	トリス塩酸緩衝液 (1mM, pH2.3)	+50.1
6	T i N S <sup>PDDA</sup>	ポリジアリルジメチルアミン クロライド (P D D A)	トリス塩酸緩衝液 (1mM, pH2.3)	+55.1
7	T i N S <sup>Cho</sup>	コンドロイチン硫酸 (C h o)	テトラメチル アンモニウム(1mM)	-70.9

[0081] T i N S<sup>Cas</sup>のゼータ電位は−43.6 mV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、T i N S<sup>Lys</sup>のゼータ電位は+50.1 mV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、T i N S<sup>PDDA</sup>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、T i N S<sup>Cho</sup>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 (C B B) 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 (0~2.0 mg/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C B B染色で定量した。その結果を図11A~図11D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、T i N S<sup>Skim</sup>及びG O N S<sup>Cas</sup>に対して同様にC B B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12A～図12Bに示す。いずれのナノシートにおいても、C B Bのタンパク質への吸着に由来する585 nm付近の吸収ピークが増加しており、T i N S及びG O N S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、T i N S<sup>Cas</sup> (0.7重量%)をトリス塩酸緩衝液(1 mM、pH 7.7)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C T 15 R E、H I T A C H I社製)を用いて遠心操作(15,000 rpm)を4℃で15分を行った。上澄み液に含まれるタンパク質をC B B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量を算出した。

同様に、T i N S<sup>Lys</sup> (0.9重量%)のトリス塩酸緩衝液(1 mM、pH 2.3)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13A～図13Bに示す。

C a s及びL y sは、いずれも5日後にもほとんどT i N S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（ $^{FL}A1b$ ）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。

$^{FL}A1b$ （ $0.5\text{ mg/mL}$ ）をトリス塩酸緩衝液（ $1\text{ mM}$ 、 $\text{pH}7.7$ ）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14Aに示す。また、ナノシートとしてトリス塩酸緩衝液（ $1\text{ mM}$ 、 $\text{pH}7.7$ ）中の $TiNS^{Cas}$ を用いた場合の結果を図14B、トリス塩酸緩衝液（ $1\text{ mM}$ 、 $\text{pH}2.3$ ）中の $TiNS^{Lys}$ を用いた場合の結果を図14Cに示す。

同様に、 $^{FL}RN-A$ （ $0.5\text{ mg/mL}$ ）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14D～図14Fに示す。

図14B及び図14Fにおいて蛍光強度が弱いことから、アニオン性の $^{FL}A1b$ 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14B及び図14F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15A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15B～図15D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<sub>2</sub>O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<sub>2</sub>O四極子相互作用の分裂ピークを図16A～図16F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<sub>2</sub>O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<sub>2</sub>O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<sub>2</sub>O四極子相互作用の分裂ピークを図17A～図

17Hに示す。

[0094] [表4]

実施例	ナノシート	溶媒
1	TiNS <sup>Cas</sup>	トリス塩酸緩衝液 (1 mM、pH 7.7)
3	TiNS <sup>Lys</sup>	トリス塩酸緩衝液 (1 mM、pH 2.3)
5	TiNS <sup>Tan</sup>	水 (pH 7.0)
6	TiNS <sup>PDDA</sup>	トリス塩酸緩衝液 (1 mM、pH 2.3)
7	TiNS <sup>Cho</sup>	水 (pH 7.0)
9	GONS <sup>Cas</sup>	トリス塩酸緩衝液 (1 mM、pH 7.7)

[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、<sup>13</sup>Cラベルしたグルコースの<sup>13</sup>C-NMR測定を行った。

NMR測定試料は、TiNS (1.5重量%) のTMA (1 mM) 溶液又はNbNS (4.0重量%) のTBA (1 mM) 溶液に、3重量%のグルコースを添加して得た。結果を図18A~図18Cに示す。

図18Aはナノシートを添加せずに<sup>13</sup>Cラベルしたグルコースの測定結果、図18BはTiNSを添加した測定結果、図18CはNbNSを添加した結果測定である。<sup>13</sup>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<sup>Cas</sup>又はNbNS<sup>Cas</sup>を用いて、<sup>15</sup>NラベルしたプロテインG β1ドメイン (<sup>15</sup>N-GB1) のNMR測定を行った。

NMR測定試料は、TiNS<sup>Cas</sup> (2.5重量%) 又はNbNS<sup>Cas</sup> (4.1重量%) のトリス塩酸緩衝液 (10 mM、pH 6.8) (D<sub>2</sub>O=10%) に、<sup>15</sup>N-GB1 (4.0 mg/mL) を添加して得た。TiNS<sup>Cas</sup>は、5~80℃の種々の測定温度で測定を行った。NbNS<sup>Cas</sup>は35℃で測定を行った。

[0098] 図19A~図19GにIPAP-HSQCスペクトルを、図20A~図2

OF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 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 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、 $\text{TiNS}^{\text{Cas}}$ 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°C)についてまとめたグラフを図21A~図21Eに示す。

[0100] 35°Cと50°C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°C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、 $\text{TiNS}^{\text{Cas}}$ (2.5重量%)と $^{15}\text{N}-\text{GB1}$ (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、 $\text{TiNS}$ (1.5重量%)と $^{15}\text{N}-\text{GB1}$ (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22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 $^{15}\text{N}-\text{GB1}$ であり、レーン3が $\text{TiNS}^{\text{Cas}}$ の上澄み液であり、レーン4が $\text{TiNS}$ の上澄み液である。

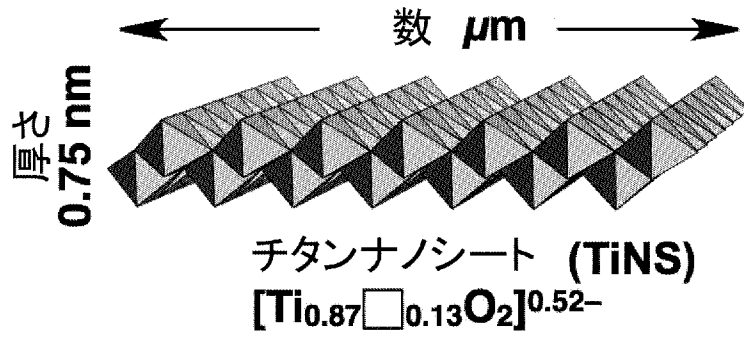
[0102]  $\text{TiNS}^{\text{Cas}}$ の上澄み液からは $^{15}\text{N}-\text{GB1}$ に由来するバンドが検出され、 $^{15}\text{N}-\text{GB1}$ が回収可能であることが確認された。

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。

## 請求の範囲

- [請求項1] ナノシートと、  
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以上の化合物と、  
を含み、前記ナノシートが前記化合物で被覆されていることを特徴とする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~100 $\mu$ m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項に記載の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。

[図1]



[図2]

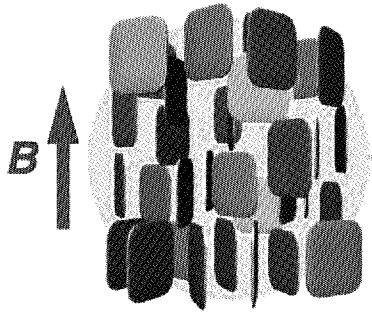


図 2A

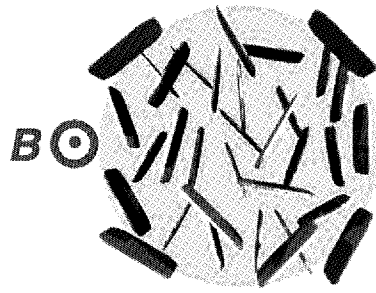


図 2B

[図3]

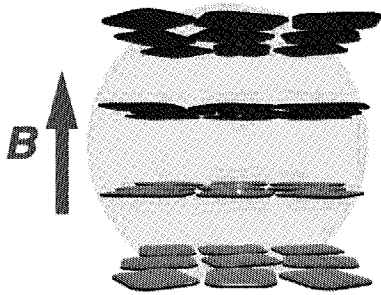


図 3A

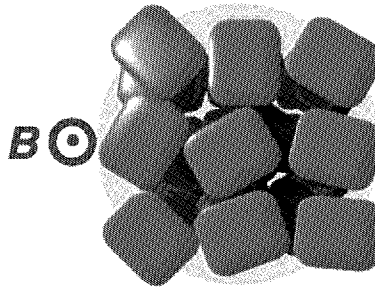
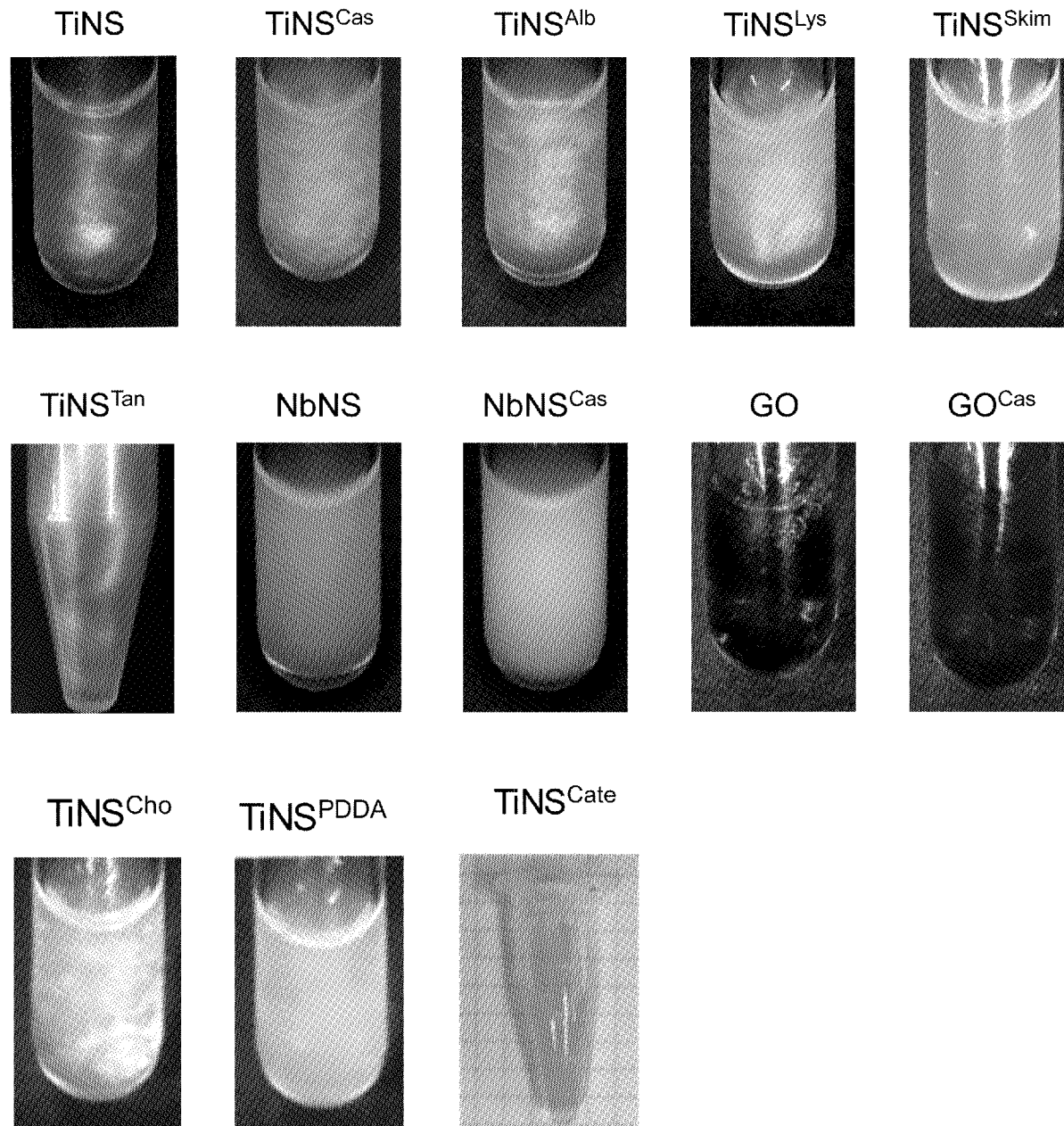
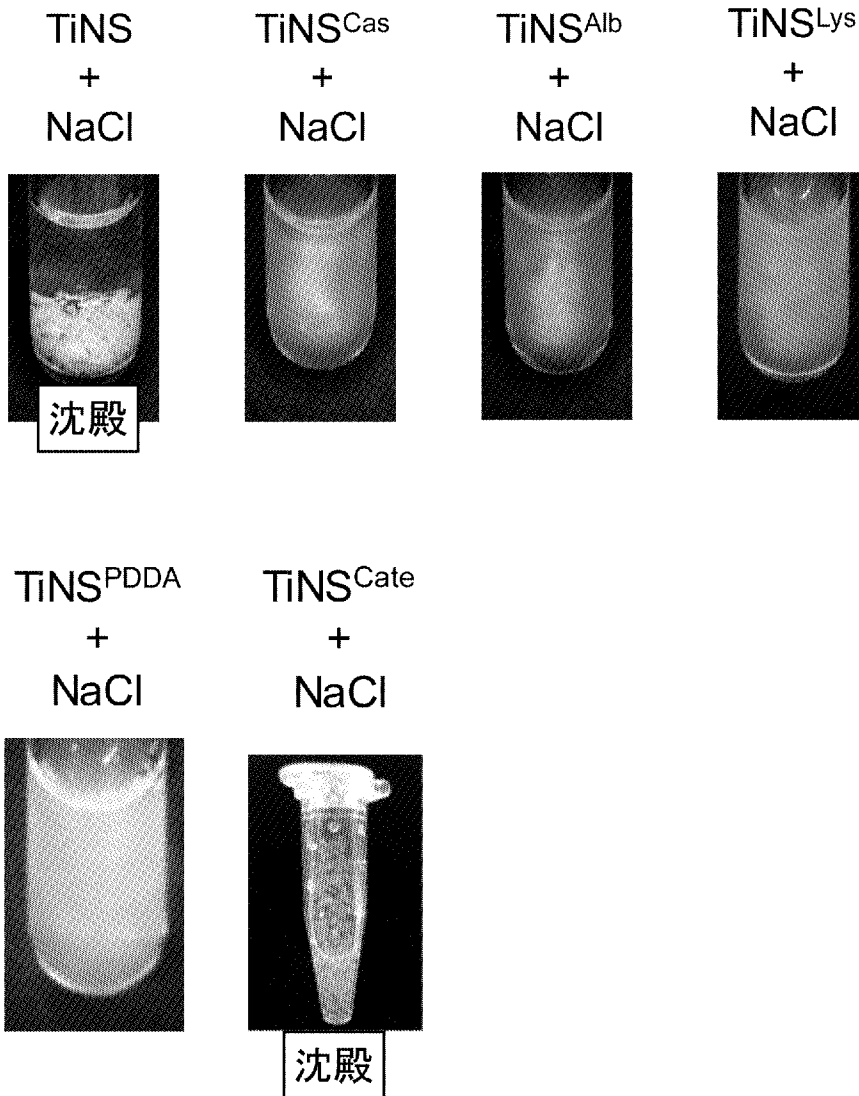


図 3B

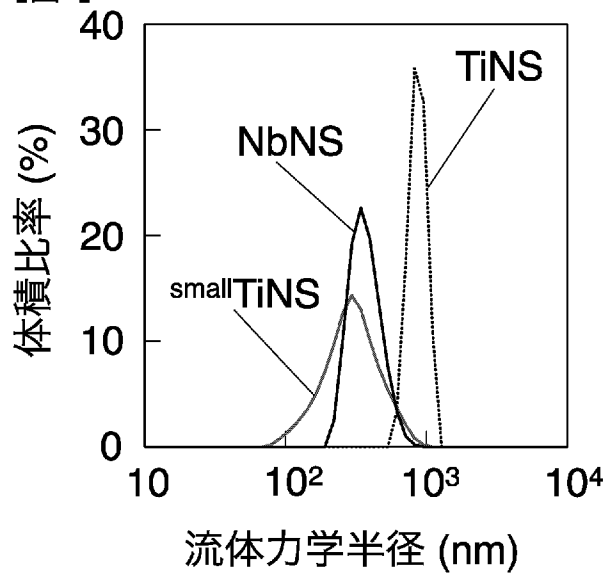
[図4]



[图5]



[图6]



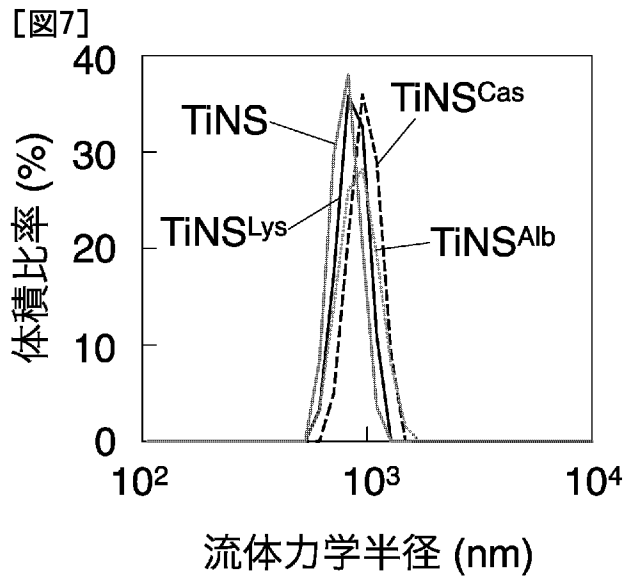


图 7A

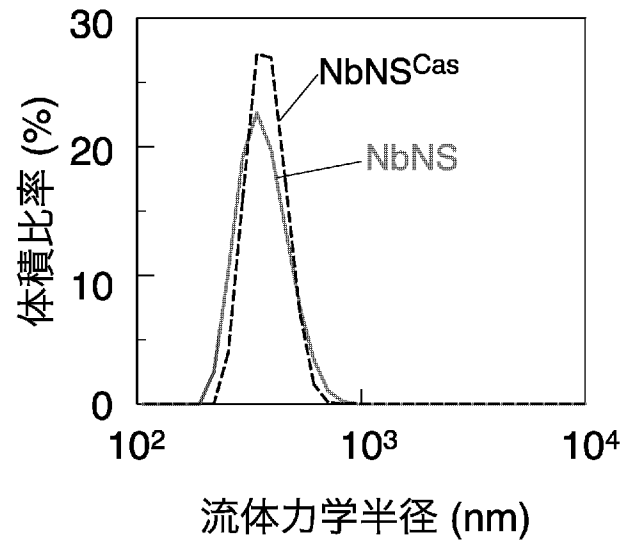


图 7B

[图8]

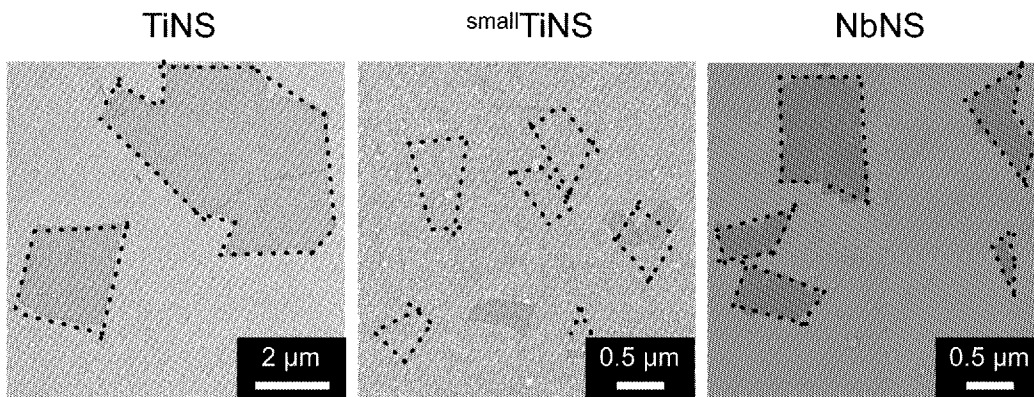


图 8A

图 8B

图 8C

[図9]

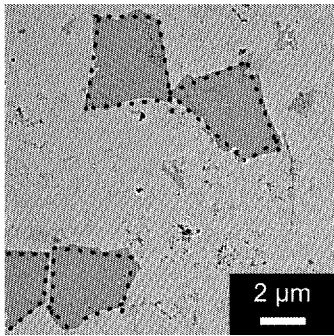
TiNS<sup>Cas</sup>

図 9A

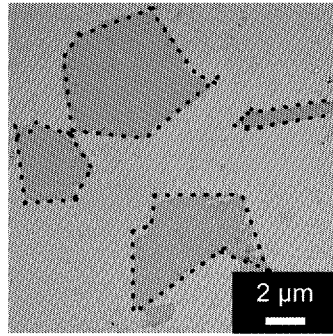
TiNS<sup>Alb</sup>

図 9B

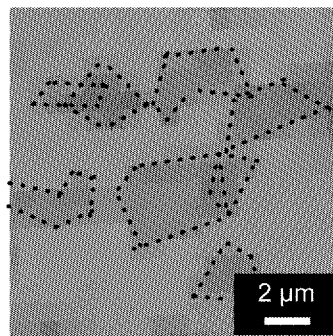
TiNS<sup>Lys</sup>

図 9C

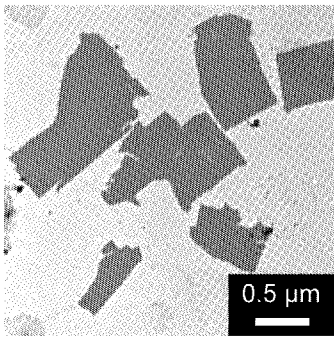
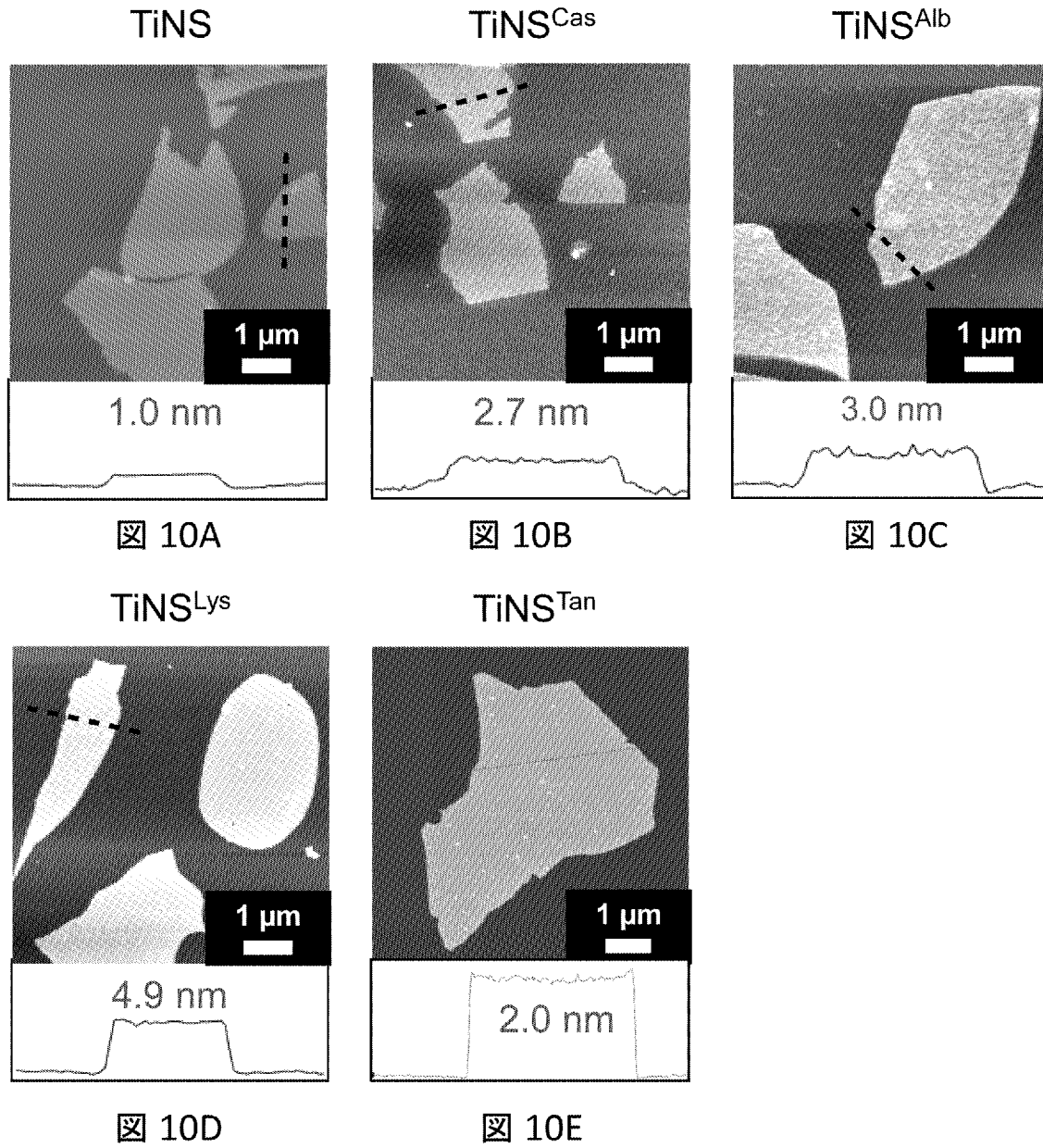
NbNS<sup>Cas</sup>

図 9D

[図10]



[図11]

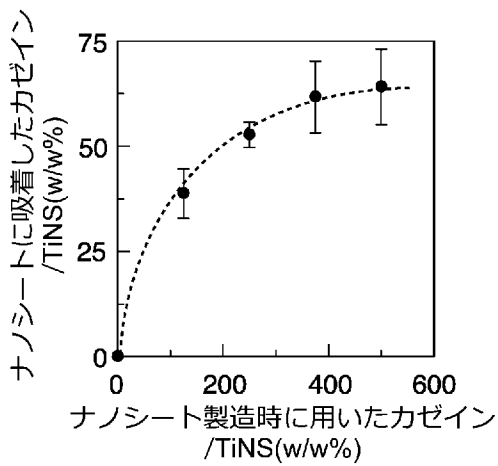


図 11A

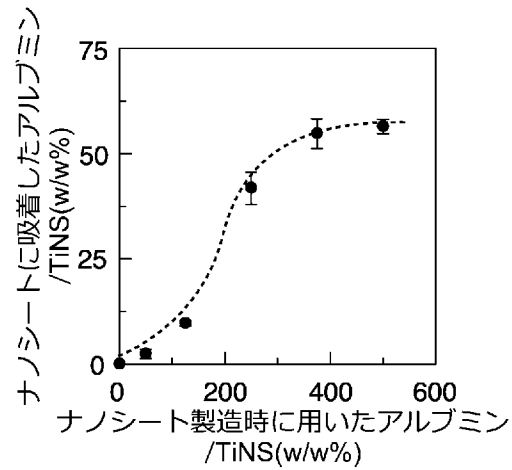


図 11B

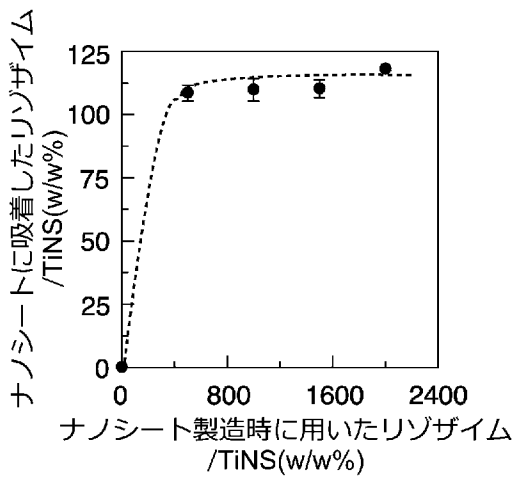


図 11C

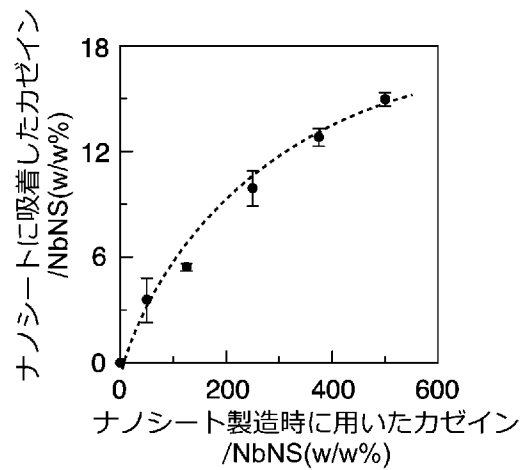


図 11D

[図12]

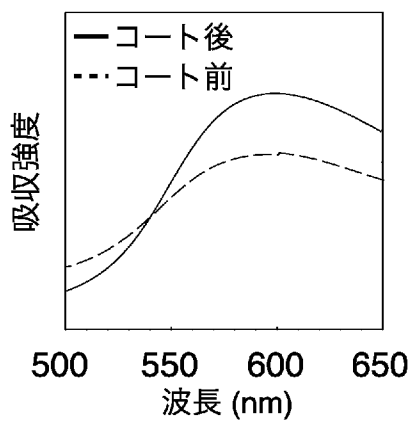
TiNS<sup>skim</sup>

図 12A

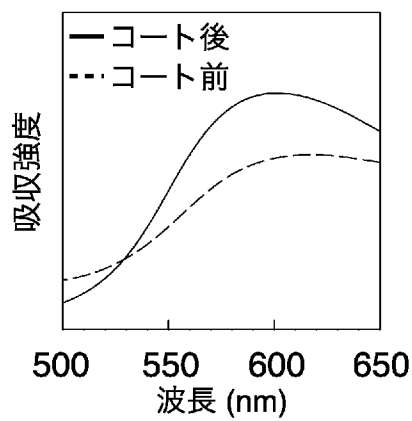
GONS<sup>Cas</sup>

図 12B

[図13]

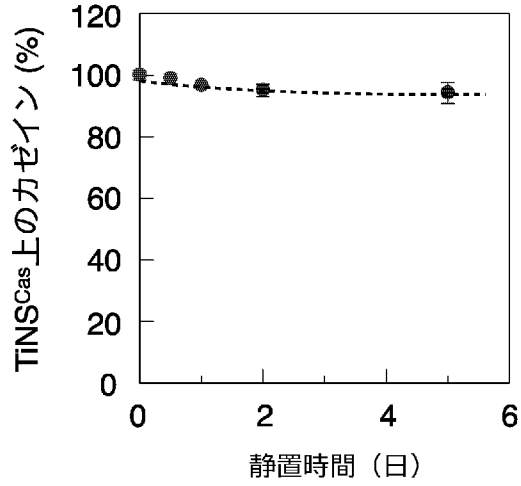


図 13A

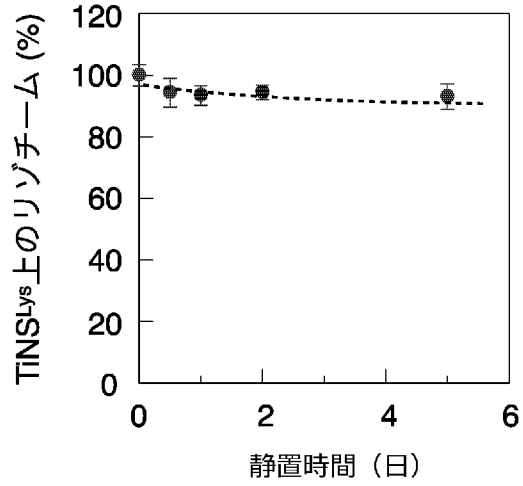


図 13B

[図14]

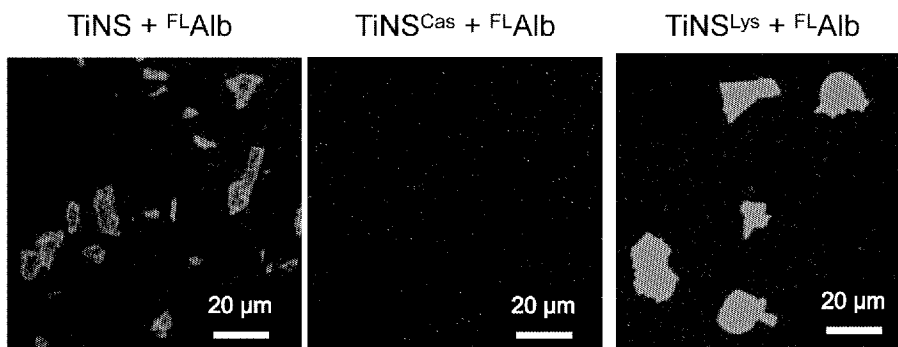


図 14A

図 14B

図 14C

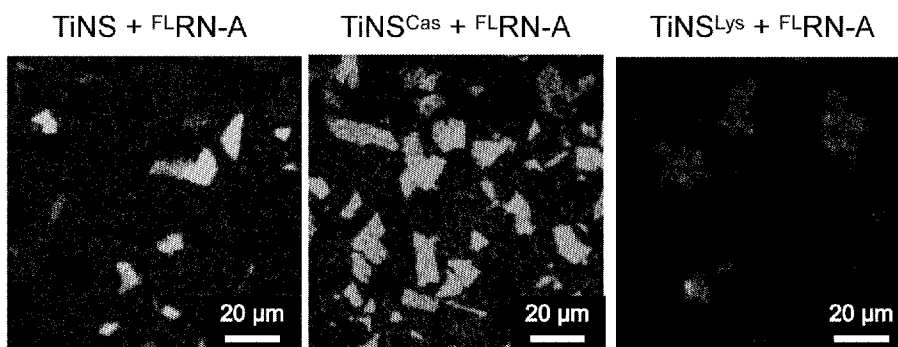


図 14D

図 14E

図 14F

[図15]

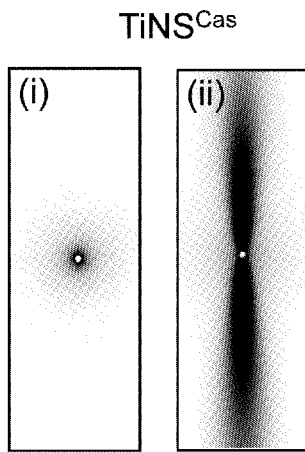
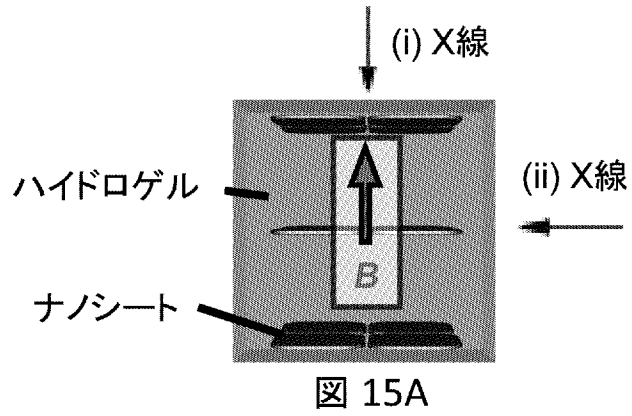


図 15B

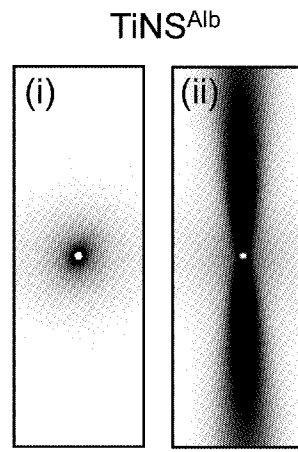


図 15C

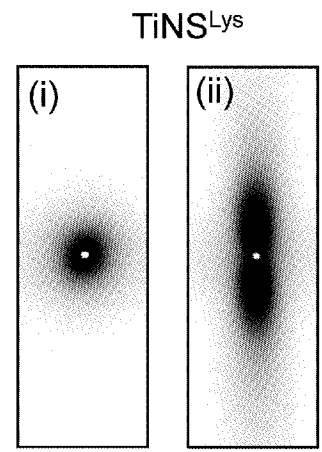


図 15D

[図16]

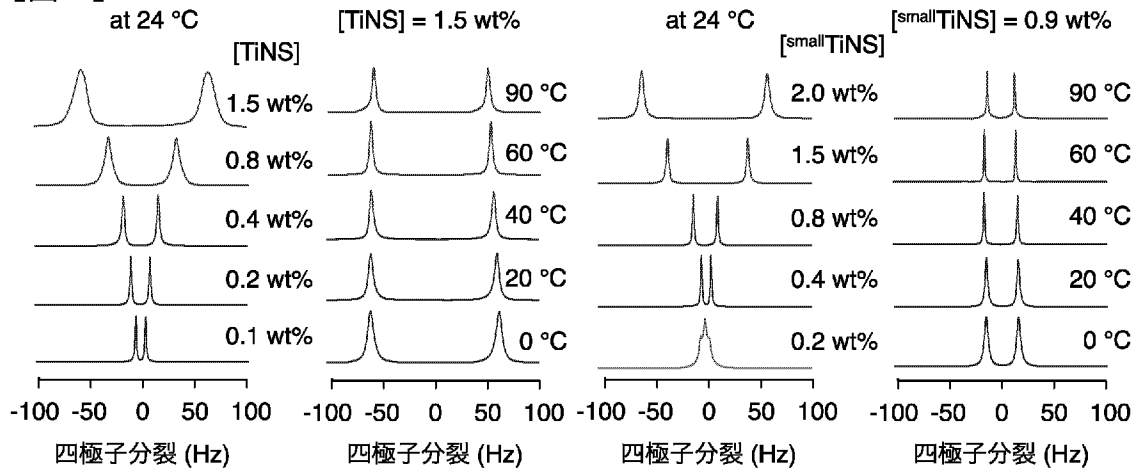


図 16A

図 16B

図 16C

図 16D

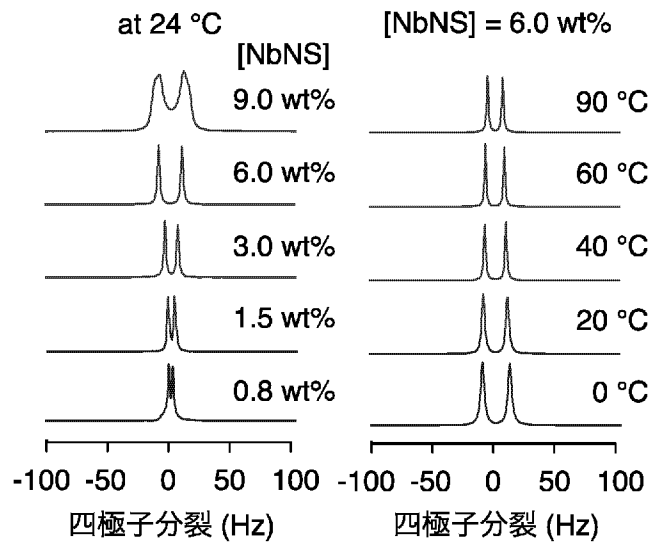


図 16E

図 16F

[図17]

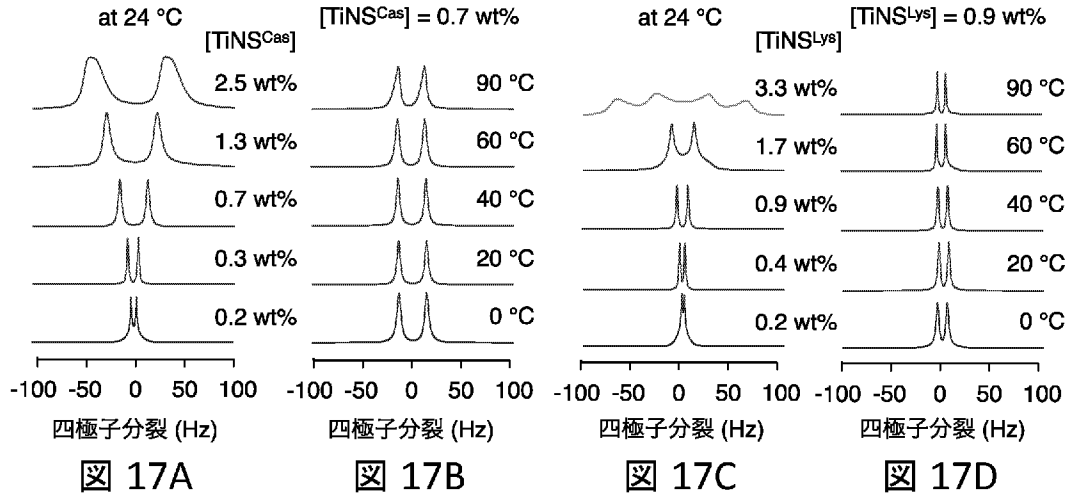
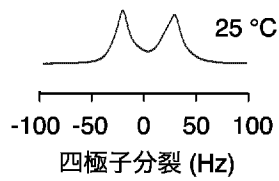
TiNS<sup>Tan</sup> ([TiNS] = 1.5 wt%)

図 17E

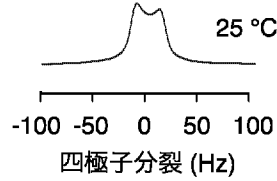
GO<sup>Cas</sup> ([GO] = 2.5 wt%)

図 17F

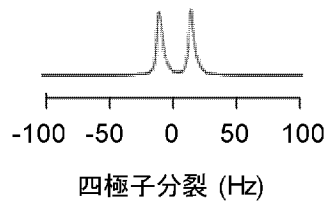
TiNS<sup>Cho</sup>

図 17G

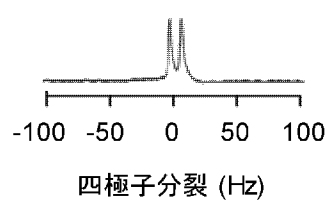
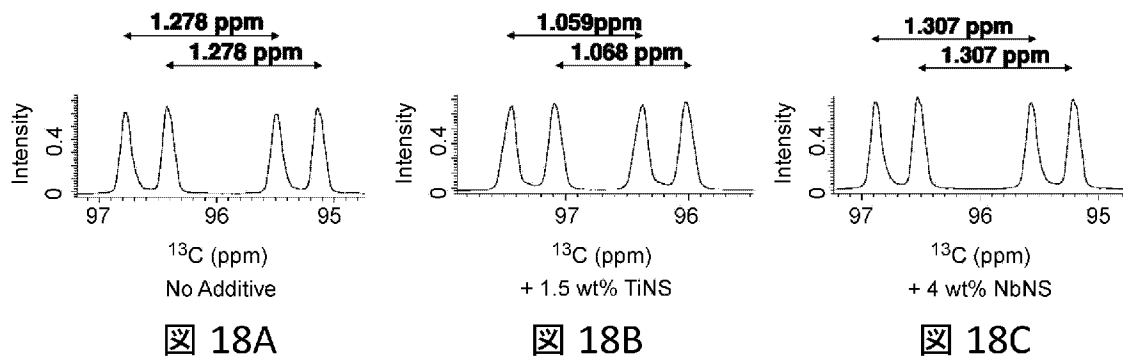


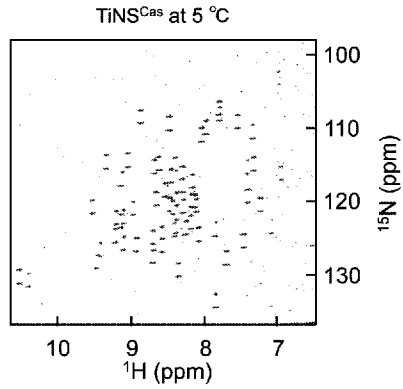

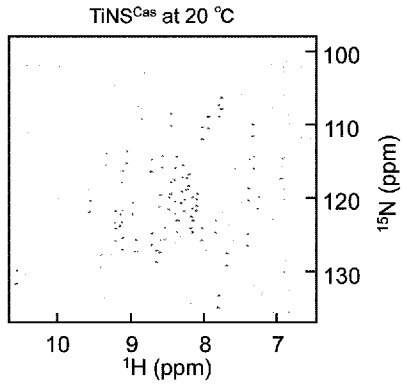

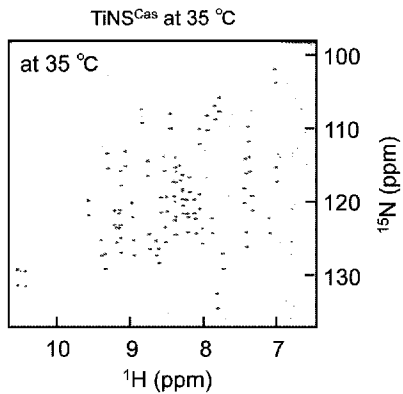

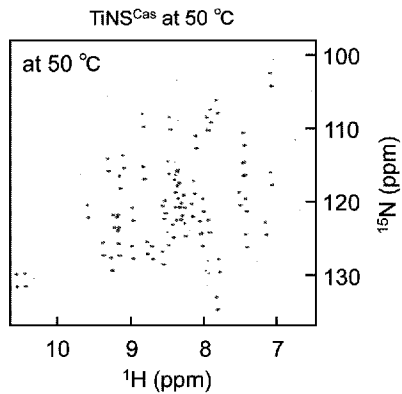

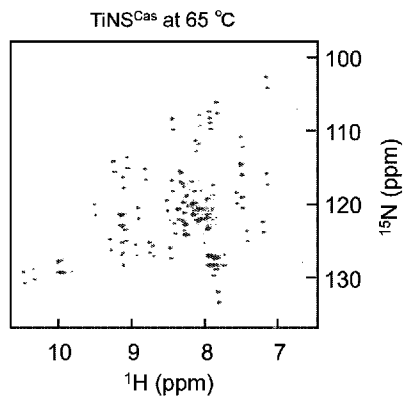

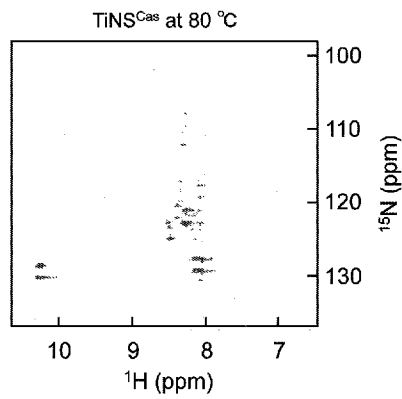

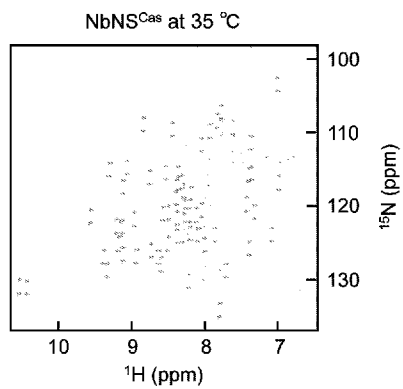
TiNS<sup>PDDA</sup>

図 17H

[図18]



[] 19] 19A 19B 19C 19D 19E 19F 19G

[ 20 ]

TiNSCas at 5 °C

Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)
S1	—	A20	0.82	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	-1.16
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	2.48	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	-2.39
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		

[ 20A ]

TiNSCas at 20 °C

Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)
S1	—	A20	-1.98	V39	1.80
T2	-4.63	V21	-2.13	D40	2.86
Y3	3.18	D22	-0.48	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	-0.64	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	5.05	E56	1.54
E19	-0.05	G38	1.89		

[ 20B ]

TiNSCas 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	-3.03	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	-1.87	K28	1.77	D47	-1.97
K10	0.68	V29	-0.19	A48	0.40
T11	2.01	F30	0.55	T49	-0.11
L12	-1.56	K31	-1.20	K50	-3.46
K13	-2.67	Q32	1.79	T51	-4.24
G14	-2.51	Y33	-0.32	F52	-5.01
E15	-2.57	A34	-0.13	T53	-1.04
T16	-3.28	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		

[ 20C ]

TiNSCas 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	-3.18	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	3.36	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	-2.23	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		

[ 20D ]

TiNSCas 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	4.80
G9	1.11	K28	-5.78	D47	0.38
K10	1.27	V29	-0.56	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	1.87
G14	4.76	Y33	2.57	F52	2.45
E15	-3.25	A34	-0.41	T53	1.82
T16	4.38	N35	-0.56	V54	-1.54
T17	0.59	D36	—	T55	-0.29
T18	0.14	N37	0.37	E56	-0.82
E19	0.23	G38	-1.13		

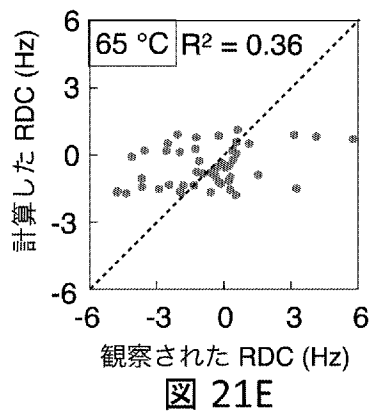
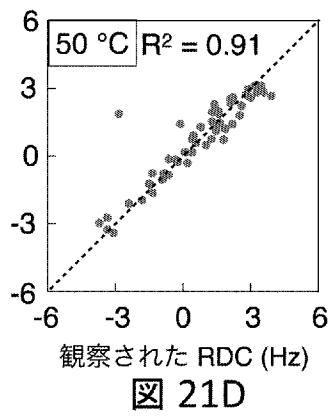
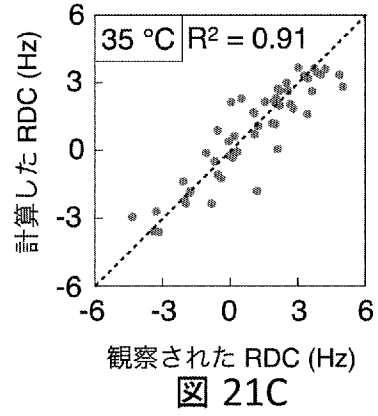
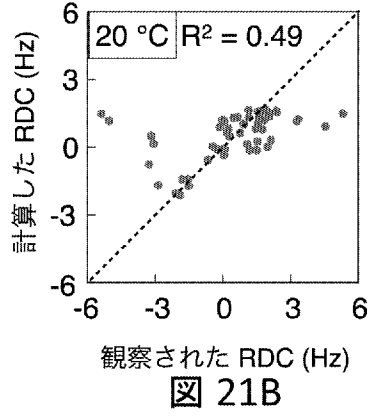
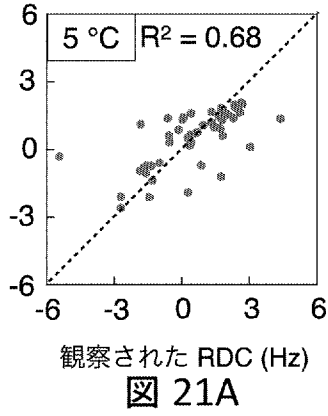
[ 20E ]

NbNSCas at 35 °C

Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)	Residue	RDC (Hz)
S1	—	A20	1.10	V39	-2.53
T2	0.32	V21	1.71	D40	-2.83
Y3	2.06	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	1.58	Y45	2.49
N8	0.89	E27	0.74	D46	2.53
G9	0.63	K28	-1.94	D47	1.21
K10	0.06	V29	0.55	A48	-1.44
T11	-1.61	F30	-0.14	T49	-0.91
L12	1.06	K31	-2.22	K50	2.18
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	-1.59	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		

[ 20F ]

[図21]

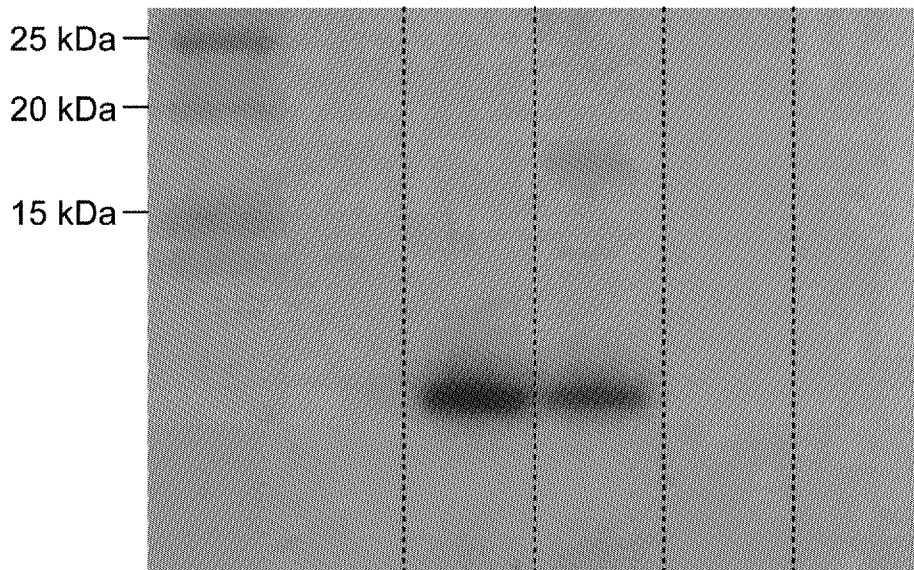


[図22]

1                    2                    3                    4

<sup>15</sup>N-GB1   <sup>15</sup>N-GB1   <sup>15</sup>N-GB1

+None   +TiNS<sub>Cas</sub>   +TiNS



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/019655

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl. G01N24/00 (2006.01) i, C01B32/198 (2017.01) i, C01G23/04 (2006.01) i,  
C01G33/00 (2006.01) i

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. G01N24/00, C01B32/198, C01G23/04, C01G33/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2013/0177503 A1 (BAO, Yuping Y.) 11 July 2013 & WO 2012/050810 A2 & EP 2621541 A2	1-8
A	YAN, Yajing, et al., "Hydroxyapatite/gelatin functionalized graphene oxide composite coatings deposited on TiO2 nanotube by electrochemical deposition for biomedical applications", Applied Surface Science, 28 February 2015, vol. 329, pp. 76-82	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
03 August 2018 (03.08.2018)

Date of mailing of the international search report  
14 August 2018 (14.08.2018)

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

Authorized officer  
  
Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/019655

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MU, Qingxin, et al., "Size-Dependent Cell Uptake of Protein-Coated Graphene Oxide Nanosheets", APPLIED MATERIALS & INTERFACES, 13 March 2012, vol. 4, pp. 2259-2266	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N24/00(2006.01)i, C01B32/198(2017.01)i, C01G23/04(2006.01)i, C01G33/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N24/00, C01B32/198, C01G23/04, C01G33/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	US 2013/0177503 A1 (BAO, Yuping Y.) 2013.07.11, & WO 2012/050810 A2 & EP 2621541 A2	1-8
A	YAN, Yajing, et al., Hydroxyapatite/gelatin functionalized graphene oxide composite coatings deposited on TiO2 nanotube by electrochemical deposition for biomedical applications, Applied Surface Science, 2015.02.28, Vol.329, Page. 76-82	1-8

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

03.08.2018

国際調査報告の発送日

14.08.2018

国際調査機関の名称及びあて先

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

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 秀直

2W

3409

電話番号 03-3581-1101 内線 3258

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MU, Qingxin, et al., Size-Dependent Cell Uptake of Protein-Coated Graphene Oxide Nanosheets, APPLIED MATERIALS & INTERFACES, 2012.03.13, Vol. 4, Page. 2259-2266	1-8