

令和 元年 6 月 26 日現在

機関番号：37112

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0217

研究課題名（和文）DNAの分子情報で無機ナノシートを操る（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Manipulation of inorganic nanosheets by molecular information of DNA(Fostering Joint International Research)

研究代表者

宮元 展義（Miyamoto, Nobuyoshi）

福岡工業大学・工学部・准教授

研究者番号：80391267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,300,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：液晶性を示していない粘土鉱物ナノシートコロイドに僅かなDNAを添加すると、強い液晶性が誘起された。これは、当初予想されていなかったDNAとナノシートの間の強い引力相互作用に起因するものであることが明らかとなった。次に、ナノシート表面に蛍光分子末端ssDNAを共有結合によって固定化する事を試みた。凍結乾燥六ニオブ酸ナノシートを出発物質として、シリル化剤との反応等によって生成物を得た。蛍光顕微鏡観察などから、DNAの固定化が確認され、また、修飾されたssDNAが相補的塩基配列のssDNAと二重鎖を形成することを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無機ナノシートやその集積体は、触媒能や光機能などのさまざまな特性を示すことから、機能材料を構築するための基礎部品として注目を集めてきた。一方、DNAは自在に連結可能な塩基配列に基づく「分子情報」を有しており、分子コンピューティングや、プログラマブルなナノ構造構築などのDNAテクノロジー研究が盛んに行われている。本研究では、DNAとナノシートの複合化を行うための基礎的知見を得ることができ、学術的に大きな進展がえられた。今後、ナノシートとDNAに基づく様々な機能材料の設計が可能となり、新しい省エネ材料や高性能デバイスなどが開発されることが期待され、社会的にも大きな意義のある成果である。

研究成果の概要（英文）：Strong liquid crystallinity was induced by adding a small amount of DNA into isotropic clay mineral nanosheet colloids. This phenomenon was explained by unexpected DNA-nanosheet attractions. Next, we investigated immobilization of fluorescence-labeled ssDNA on nanosheet surfaces through covalent bond. The reaction product was obtained by the reaction of freeze-dried nanosheets with silylation reagents. By fluorescence microscopy and other techniques, immobilization of the ssDNA was confirmed. Further, the immobilized ssDNA was found to form double stranded DNA with the ssDNA with complementary sequences.

研究分野：機能材料化学

キーワード：ナノシート DNA

## 様式 F - 19 - 2

### 1. 研究開始当初の背景

DNA の分子情報を利用してプログラマブルなナノ構造構築や分子計算を行う DNA ナノテクノロジー研究が近年注目を集めている。近年では、DNA をリンカーとしたコロイド粒子の機能化と組織化が報告されている。例えば 1 本鎖 DNA(ssDNA)が修飾されたコロイド粒子に、特定塩基配列の ssDNA を両端に持つリンカーを加えると、両端での 2 重鎖形成によって粒子が架橋され、コロイド粒子が集積したコロイド結晶がえられる。ssDNA の塩基配列は自在に設計できるので、修飾する ssDNA やリンカーに用いる塩基配列によってコロイド結晶の構造や格子定数を精密に制御できる。これらの報告では、球状粒子のみが用いられてきたが、異方性粒子を利用することでさらなる多様な構造の形成や応用が期待できる。

一方ナノシートは無機層状物質を水溶液中で剥離・分散することで得られ、厚さ 1nm、横幅最大数百  $\mu\text{m}$  と異方的な形状を有している。ssDNA によるナノシートの機能化と組織化は数例報告されており、刺激応答性ゲル化剤、ナノコンテナ、バイオセンサへの応用が提案されている。しかし、いずれもナノシートの表面に ssDNA を物理的に吸着したものであり、構築した複合体の安定性も不十分である。またナノシートコロイドは、複屈折および構造色を有する液晶相を形成するが、これらを DNA によって制御した例はない。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、溶媒に分散した無機ナノシート表面に一本鎖 DNA(ssDNA)を化学修飾することで、入力分子(相補の ssDNA など)や他の ssDNA 修飾ナノシートを特異的に認識する系を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)DNA/ナノシート混合コロイド

DNA/ナノシート複合系についての基礎的知見を得るため、DNA とナノシートを単純に混合したコロイド系についての検討を行った。ナノシートとして、粘土鉱物の一種である天然バイデライト(SBId-1)および天然モンモリロナイト(Kunipia-F)を精製して用いた。DNA には鮭白子由来の分子量の大きいもの(10<sup>4</sup> b.p.程度)と小さいもの(300 b.p.程度)を用いた。これらを様々な比率で混合した水系コロイド溶液を作成し、クロスニコルによる観察と小角 X 線散乱測定(SAXS)を行った。また、紫外可視分光によって、粘土鉱物への DNA の吸着挙動を検討した。

#### (2)ssDNA 修飾ナノシートの合成

N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)に、凍結乾燥した六ニオブ酸塩ナノシートコロイド、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、トリエチルアミンを加え、130 °Cで 1 日攪拌し、アミノ基末端ナノシートを合成した。また DMF 中にアミノ基末端六ニオブ酸塩ナノシート、トリエチルアミン、無水コハク酸を加え、室温で 8 時間攪拌し、カルボキシル基末端ニオブ酸塩ナノシートを得た。最後にカルボキシル基末端ニオブ酸塩ナノシート、FITC(蛍光色素)をラベリングしたアミノ基末端 DNA、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボイミド塩酸塩、N-ヒドロキシスルホスクイミドナトリウムを MES バッファー(pH7.0)に加え、室温で 6 時間攪拌し、ssDNA 修飾六ニオブ酸塩ナノシートを得た。また FITC-ssDNA 修飾ナノシート分散液に消光分子をもつ相補的な ssDNA を加え共焦点顕微鏡で(CLSM)観察した。

#### (3)DMF/水混合溶媒中でのナノシート表面へのシリル化

六ニオブ酸ナノシートが分散した DMF/水混合溶媒(99 : 1)にジメチルメトキシオクタデシルシランを加え、室温または 60°Cで 3 日または 7 日攪拌し、ジメチルメトキシオクタデシルシラン修飾ナノシートを合成した。小角 X 線散乱を用いて生成物の構造解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)DNA/ナノシート混合コロイド

バイデライト単独のコロイドは 11.2 g/L 以上の濃度で液晶示し、DNA 単独の溶液は今回の実験で用いた数 g/L 以下では液晶性を示さなかった。しかし、液晶性を示していないバイデライトコロイド(8 g/L)に僅かな DNA(0.2 g/L)を添加すると、強い液晶性が誘起された。一方、バイデライト単独のコロイドの SAXS 測定では、ナノシート間平均距離が 160 nm であったが、DNA を添加すると、加えた DNA の量に依らず約 40 nm のナノシート間平均距離となった。バイデライトへの DNA の吸着等温線を作成したところ、DNA はバイデライトに強く吸着することが分かった。分子量の異なる DNA を用いた場合や、粘土鉱物モンモリロナイトを用いた場合でも、全般的に、ほぼ同様の傾向が確認された。

DNA とナノシートは、共に、水中で負電荷を有する。したがって、当初の予想としては、これらを混合した場合に、系は反発力支配となり、主に枯渇相互作用によるミクロ相分離で液晶相のわずかな構造変化が起こると予想していた。しかし検討の結果、上述のように、DNA と粘土鉱物ナノシート間に引力が作用し、大きな変化が現れた。これは、ナノシートの辺縁部の水酸基

と DNA のリン酸部位の間の水素結合によるものと考えられた。この結果、DNA がナノシートを弱く橋かけし、液晶相形成を著しく促進したものと考えられた。

### (2) ssDNA 修飾ナノシートの合成

末端に蛍光分子(FITC)を有するssDNAをナノシート表面に修飾し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。後方散乱モードでは、未修飾ナノシート、ssDNA修飾ナノシートともに、数 $\mu\text{m}$ の大きさのナノシートが観察された。一方蛍光モードでは、ssDNA修飾処理をした後でのみ、像が得られたことから、ナノシートへのDNA修飾が示唆された。一方、合成に用いたssDNAの末端のアミノ基がプラスに帯電して、アニオン性の六ニオブ酸塩ナノシート表面に静電的に吸着している可能性も考えられた。そこで比較として、未修飾の六ニオブ酸塩ナノシートコロイドにssDNAを加えて攪拌し、ろ過して再分散したものを観察した。しかしこの場合ではほとんど蛍光は観察されなかった。これらのことよりssDNAは六ニオブ酸塩ナノシートの表面に共有結合を介して修飾されていることが強く示唆された。合成の各ステップでの赤外分光測定からも、共有結合によってssDNAがナノシートに修飾されていることが示唆された。

さらに、合成した FITC-ssDNA 修飾ナノシートに消光分子をもつ相補的な塩基配列の ssDNA を加え、ハイブリダイゼーションによる消光が起こるかの確認を行なった。添加前では蛍光が点在していたが、ssDNA を添加後時間が経過するにつれ蛍光が消光し、15 分経過すると完全に消光している。このことより消光-ssDNA が FITC-ssDNA 修飾ナノシートにハイブリダイゼーションしていると考えられた。ナノシート表面という、特異な反応場においてもハイブリダイゼーションが確認されたことは、今後の応用研究に向けての重要なステップである。

### (3)DMF/水混合溶媒中でのナノシート表面へのシリル化

ナノシートはイオン性・親水性であるため、完全剥離状態を維持するためには、溶媒が水であることが好ましい。しかし、ナノシート表面へのシリル化反応では脱水トルエンなどの有機溶媒を用いるのが一般的であり、双方の条件を充たすことは難しかった。(2)の検討では、ナノシートの凍結乾燥体を用いた有機溶媒中での反応によってナノシート表面への DNA 修飾を試み、これに成功した。しかしなら、修飾量が極めて少ないという問題があった。そこで、この状況を抜本的に改善するため、DMF/水混合溶媒を用いて、完全剥離状態を維持したままで、シリル化反応を進行させるための条件検討を行った。

シリル化反応後のサンプルについて小角 X 線散乱結果を用いて構造解析を行ったところ、未修飾の六ニオブ酸塩ナノシートは、 $d = 2.0 \text{ nm}$  の六ニオブ酸塩ナノシートの積層構造に帰属されるピークが観察された。一方、ジメチルメトキシオクタデシルシラン修飾ナノシートでは  $d = 4.1 \text{ nm}$  の六ニオブ酸塩ナノシートの積層構造に帰属される鋭いピークが観察された。六ニオブ酸塩ナノシートの厚さ  $1.4 \text{ nm}$ 、修飾されたジメチルメトキシオクタデシルシランの長さを  $2.4 \text{ nm}$  と仮定すると、六ニオブ酸塩ナノシートの表面から  $32.5$  度傾いて修飾されていると考えられた。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

### [雑誌論文](計 10 件)

1. **Key Eng. Mater.**, **2019**, 804, 75-82, Y. Ye, M. Nishi, Y. Wenqi, M. Takinoue & N. Miyamoto "Synthesis of Photocatalytic Niobate Nanosheet/Polymer Composite Microgel Particles through Microfluidic Approach"
2. **Sci. Rep.** **2018**, 8, "Swelling Inhibition of Liquid Crystalline Colloidal Montmorillonite and Beidellite Clays by DNA" Yamguchi, N.; Anraku, S.; Paineau, E.; Safinya, C. R.; Davidson, P.; Michot, L. J.; Miyamoto, N.
3. **Dalton Trans.** **2018**, 47, 3022-3028, "Massive hydration-driven swelling of layered perovskite niobate crystals in aqueous solutions of organo-ammonium bases" Song, Y.; Iyi, N.; Hoshide, T.; Ozawa, T. C.; Ebina, Y.; Ma, R.; Yamamoto, S.; Miyamoto, N.; Sasaki, T.
4. **J. Phys. Chem. B** **2018**, 122, 2957-2961, "Anisotropic self-oscillating reaction in liquid crystalline nanosheets hydrogels" Shintate, M.; Inadomi, T.; Yamamoto, S.; Kuboyama, Y.; Ohseido, Y.; Arimura, T.; Nakazumi, T.; Hara, Y.; Miyamoto, N.
5. **科学と工業** **2017**, 91, 85-95, "無機ナノシートの多彩な機能と応用" Miyamoto, N.; Kato, R.
6. **高分子論文集** **2016**, 73, 262-280, "無機ナノシート液晶:二次元無機高分子が自発形成する組織化構造" 宮元展義; 山本伸也.
7. **Kobunshi Ronbunshu** **2016**, 73, 262-280, "Inorganic Nanosheet Liquid Crystals: Self-Assembled Structures in Dispersions of Two-Dimensional Inorganic Polymers (in Japanese)" Miyamoto, N.; Yamamoto, S.
8. **Nanosci. Nanotechnol. Lett.** **2016**, 8, 355-359, "Recent Developments in Hybrid Hydrogels Containing Inorganic Nanomaterials" Malgras, V.; Kamachi, Y.; Nakato, T.; Yamauchi, Y.;

- Miyamoto, N.
9. *Mater. Lett.* **2016**, *168*, 176-179, "Thermo-Responsive Hydrogels Containing Mesoporous Silica toward Controlled and Sustainable Releases" Kamachi, Y.; Bastakoti, B. P.; Miyamoto, N.; Nakato, T.; Yamauchi, Y.
  10. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1594 - 1597, "Sandwich organization of non-ionic surfactant liquid crystalline phases as induced by large inorganic K<sub>4</sub>Nb<sub>6</sub>O<sub>17</sub> nanosheets" Guégan, R.; Sueyoshi, K.; Anraku, S.; Yamamoto, S.; Miyamoto, N.

[学会発表](計 105 件)

1. 宮元 展義 "無機ナノシートを利用した超構造機能材料の創成" 超然プロジェクト講演会, 金沢大学, 2018年2月、招待講演
2. Nobuyoshi Miyamoto "Colloidal Liquid Crystal of Inorganic Nanosheets" Seminar at Institut de Chimie et Physique des Matériaux de Strasbourg (IPCMS-DMO), November 14, 2018, Strasbourg, France, 招待講演
3. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystalline inorganic nanosheets meet with exotic biomatters" CEA Grenoble Seminar, July 5, 2018, Grenoble, France, 招待講演
4. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystalline inorganic nanosheets with exotic biomatters" caaed seminar series, November 21, 2018, Dresden, Germany, 招待講演
5. Nobuyoshi Miyamoto "Oxide nanosheets for solid-state nanomaterials and soft materials " Department Seminar of Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft , November 9, 2018, Berlin, Germany, 招待講演
6. Nobuyoshi Miyamoto "Anisotropic Materials of Liquid Crystalline Nanosheet/Polymer Composites" France-Japan Workshop 2018 on Nanomaterials and Soft Materials, November 13, 2018, Paris, France, 招待講演
7. 宮元 展義, 稲富 巧, 山本 伸也, 浦山 健治 "液晶性無機ナノシート/高分子複合ゲル" 第 67 回高分子討論会, 2018年9月, 札幌, 招待講演
8. 宮元 展義, 諸岡 時希, 古川 聡起, 稲富 巧, 大背戸 豊 "無機ナノシート液晶を複合化したエラストマーとゲル" 第 67 回高分子討論会, 2018年9月, 札幌, 招待講演
9. Nobuyoshi Miyamoto "New Composite Materials for Energy Devices " The 5th International Conference on Nanomechanics and Nanocomposites (ICNN5), August 25, 2018, 福岡工大, 招待講演
10. Nobuyoshi Miyamoto "Inorganic Nanosheets for Soft Materials: Liquid Crystal, Composite Gel, and Structural Color" The 30th PPC-PETROMAT, June 5, 2018, Bangkok, Thailand, 招待講演
11. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystalline inorganic nanosheets with exotic biomatters" The 1st Columbia "Molecules, Materials, Devices and Systems in Medicine" Workshop, May 29, 2018, New York, USA, 招待講演
12. 宮元展義, 安樂信哉, 山口直哉, Cyrus R. Safinya, Laurent J. Michot, Erwan Paineau, Patrick Davidson "DNA/粘土鉱物ナノシート混合系でのメソスケール構造形成" 高分子基礎研究会 2017, 敦賀, 招待講演
13. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystal phase of Inorganic nanosheet colloid and their applications" US-Japan Workshop 2018 on Functional Soft-Materials and Nano-Composites, February 2018, Colorado Boulder Univ, USA, 招待講演
14. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystalline inorganic nanosheets meet with exotic biomatters" Invited seminar at Columbia University, March 2018, Columbia Univ., USA, 招待講演
15. 山本伸也, 宮元展義 "構造色を持つナノシート液晶" 平成 29 年度物理化学インターカレッジセミナー 兼 油化学界面科学部会九州地区講演会, January 2018, 由布院, 招待講演
16. 宮元展義 "無機ナノシートソフトマテリアル: 液晶と構造色とゲル" 信州大学セミナー, 2017年10月, 上田, 招待講演
17. 宮元展義, 稲富巧, 浦山健二 "電場により巨視的に配向した無機ナノシート液晶と複合化された pNIPA ゲル" 高分子学会討論会, Sept. 2017, 愛媛, 招待講演
18. Nobuyoshi Miyamoto "Structural colors of inorganic nanosheet liquid crystals" France-Japan Workshop 2017 on Nanomaterials and Soft Materials, July 2017, Paris, France, 招待講演
19. Nobuyoshi Miyamoto "" Séminaire, Bayreuth University, July 2017, Bayreuth, Germany, 招待講演
20. Nobuyoshi Miyamoto "Soft inorganic materials: the liquid crystalline colloids of inorganic nanosheets with ultra-high aspect ratio" Séminaire, Institut de Physique de Rennes, July 2017, Rennes, France, 招待講演
21. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystalline colloids of inorganic nanosheets" Séminaires Matière Molle, LPS, Univerasié Paris Sud, July 2017, Paris, France, 招待講演
22. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystal phase of inorganic nanosheet colloids and their applications" The 2nd Japan-Taiwan Joint Workshop on Nanospace Materials, Dec. 2016, NIMS, Japan, 招待講演

23. 山本伸也、宮元展義 "粘土鉱物コロイドの構造色" 第60回粘土科学討論会, 2016年9月, 九大,招待講演
  24. 宮元展義 "液晶性粘土コロイドを利用した新しい粘土/ポリマー複合体の合成" 第60回粘土科学討論会, 2016年9月,九大,招待講演
  25. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystal phase of inorganic nanosheet colloids and their applications" RIKEN CEMS Topical Meeting 2016 "Nanoparticles / Nanotubes / Nanosheets", 2016年9月,RIKEN, Saitama, Japan,招待講演
  26. Nobuyoshi Miyamoto "Inorganic nanosheet liquid crystals and their applications" SPIE2016, Aug. 2016, San Diego, USA,招待講演
  27. Nobuyoshi Miyamoto "Photothermal responsive gel of nanosheet-polymer composite" Workshop on smart polymers, Aug. 2016, Hulunbuir, China,招待講演
  28. "Nobuyoshi Miyamoto ""Functional soft materials fabricated with inorganic nanosheets"" Workshop on smart polymers, Aug. 2016, Beijing Forestry University, China,招待講演"
  29. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystalline nanosheets and composite gel" The 1st FIT-ME Symposium, May 2016, Fukuoka, Japan,招待講演
- その他 76 件

〔図書〕(計4件)

1. 中戸晃之; 宮元展義, 13章: 無機ナノシート液晶. In *CSJカレントレビュー25「二次元物質の科学」*, 日本化学会, Ed. 化学同人: 2017; pp 133-139.
2. Nakato, T.; Miyamoto, N., Chapter 13: Inorganic Nanosheet Liquid Crystals (in Japanese). In *CSJ current review*, Kagaku Dojin: 2017; pp 133-139.
3. Miyamoto, N.; Yamamoto, S., Chapter 7: Functional Layered Compounds for Nanoarchitectonics. In *Supramolecular Nanoarchitectonics*, Ariga, K.; Aono, M., Eds. Elsevier: 2017; pp 173-192.
4. Miyamoto, N.; Ohseido, Y.; Nakato, T., Chapter 8: Colloidal nanosheets. In *Inorganic Nanosheets and Nanosheet-Based Materials*, Nakato, T.; Kawamata, J.; Takagi, S., Eds. Springer: 2017; pp 201-260.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 無機ナノシート - ポリマー複合体の製造方法、及び無機ナノシート - ポリマー複合体  
 発明者: 宮元 展義、古川 聡起、大背戸 豊  
 権利者: 学校法人福岡工業大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2018-140339  
 出願年: 2018  
 国内外の別: 国内

名称: 無機ナノシート - ポリマー複合体の製造方法、及び無機ナノシート - ポリマー複合体  
 発明者: 宮元 展義、諸岡 時希、大背戸 豊  
 権利者: 学校法人福岡工業大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2018-140340  
 出願年: 2018  
 国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: 無機ナノシート分散液、及び無機ナノシート分散液の製造方法  
 発明者: 宮元展義, 山本伸也, 三原屋淳史  
 権利者: 学校法人福岡工業大学  
 種類: 特許  
 番号: JP 2015-145322 A  
 取得年: 2017  
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.fit.ac.jp/~miyamoto>

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：Patrick Davidson

ローマ字氏名：Patrick Davidson

所属研究機関名：Université Paris-Sud

部局名：Laboratoire de Physique des Solides

職名：Professor

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：浅沼 浩之

ローマ字氏名：Hiroyuki Asanuma

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。