Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

精密分子認識空間構築を実現する配向性分子インプリンティング

北山, 雄己哉
竹内, 俊文

(Citation)
分析化学,68(2):89-101

(Issue Date)
2019-02

(Resource Type)
journal article

(Version)
Version of Record

(Rights)
© 2019 The Japan Society for Analytical Chemistry

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/90005746

BUNSEKI KAGAKU Vol. 68, No. 2, pp. 89–101（2019）

© 2019 The Japan Society for Analytical Chemistry

年間特集「膜」：総合論文

精密分子認識空間構築を実現する配向性分子インプリンティング

北山雄己哉[1]，竹内　俊文*[1]

均一性の高い親和性と選択性をもつ分子認識材料は，高感度バイオセンサをはじめとした現在の分析科学とその産業への展開において欠かせない材料である．本稿では，この均一性の高い結合特性をもつことが期待される人工分子認識材料を創製する手法として，配向性分子インプリンティング技術について概説する．本手法は，鋳型分子を配向固定化し，制御/リビングラジカル重合によるボトムアップ型ポリマー薄膜形成技術を利用して精密な分子認識空間をもつ分子インプリントポリマー（MIPs）を得るものであり，従来法では発現できない高い親和性と選択性を示す分子認識空間の形成が可能となった．一連の研究で，低分子の生体成分や生物活性物質，また生体高分子であるがんマーカータンパク質や糖タンパク質が標的分子である場合の，それぞれに適した配向固定化方法を提案している．さらに本アプローチは，本稿でまとめた高感度バイオセンサの開発に限らず，高性能アフィニティ分離剤や薬物送達への応用が期待できることから，今後，バイオテクノロジーやナノテクノロジーなど様々な領域への波及効果が期待できる．

1　はじめに

1･1　抗体：生物由来の分子認識材料

生体は，様々な分子が精密に機能し合い生命が維持されている．中でも特定の分子と相互作用する「分子認識」という現象は，生命活動における最も重要なプロセスの一つであり，生体内における分子間コミュニケーションに必要不可欠である．例えば，DNA に保存された遺伝情報を翻訳し，様々なタンパク質を生合成するために，多段階の精密な分子認識プロセスが必要とされる．また病原体が体内に入った場合，その外敵を異物として認識し，体内に数多く存在する抗体産生細胞から，その病原体に対応する抗体産生細胞を選択することで，標的の外敵に対して免疫応答を引き起こすために有効な抗体を生み出している．このような生命が進化の過程で培った「分子認識」という機能を担う分子（抗体など）を生体外で応用することで，これまでに様々な産業や医療が発達してきた．例えば，クロマトグラフィ担体に分子認識材料を担持させることで，タンパク質精製に用いられるアフィニティクロマトグラフィが開発された[1)2)]．また，分子認識材料をセンシングデバイスに修飾するとバイオセンサへ応用できる[3)4)]．このように，分子認識材料は，現在の科学や産業の発展にはなくてはならないものとなっている．

分子認識材料として最も有用な生体分子である抗体は，一般的に動物に抗原を投与し免疫後，血清を精製することによって得られる．しかしながら，抗原には，様々なエピトープ（抗原決定部位）が存在するため，このようにして得られた抗体は，抗原中の様々なエピトープを認識する抗体が同時に得られる（ポリクローナル抗体）．そのため，ポリクローナル抗体では抗原に対する選択性が高くなく，高親和性分子認識材料を必要とする高感度バイオセンサや抗体医薬などの開発には適していない．そのような中，抗体産生細胞と骨髄腫細胞を融合したハイブリドーマ細胞を作製し，目的の抗体を産生するクローンを選別・培養し，そこから産生される抗体を精製することで，エピトープが均一なモノクローナル抗体を作製する方法が開発された[4)～7)]．このモノクローナル抗体は，認識するエピトープが単一なため，抗原に対するアフィニティの均一性が高く，例えばバイオセンサとして利用する場合，バックグラウンドを低下させることが可能となり，同一のモノクローナル抗体を使用している限り，高い再現性で安定したセンシングが可能となる．抗体医薬として用いる場合，副作用の低減のため交差反応性を低く保つ必要があることから，高い分子認識能を示すモノクローナル抗体を使用することは必須である．このようにモノクローナル抗体は科学・産業の発展を大きく推進したことから，開発者らが 1984 年にノーベル生理学・医学賞を受賞している．

しかしながら，生体内で分子認識能を担うタンパク質である抗体（ポリクローナル抗体）は，本質的に不安定である上に，動物に免疫後，血清を採取し，多段階のクロマトグラフィによる精製を経ることで獲得する必要があり，モ

* E-mail : takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp
[1] 神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻：657-8501　兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1

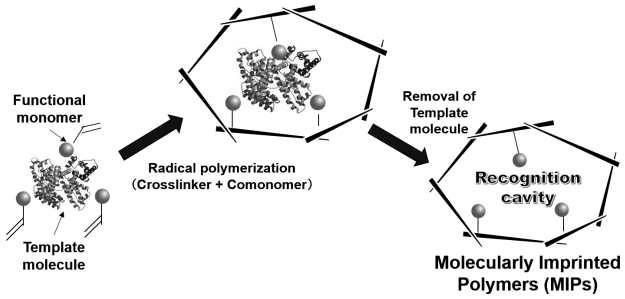

Fig. 1 Molecular Imprinting

ノクローナル抗体を得るためには，さらに煩雑な合成プロセスを必要とする．動物が免疫によって抗体を産生できない親水性，疎水性や毒性分子も存在する．そのため，非常に煩雑な合成プロセスを必要とする生体由来の抗体の代替物として，より簡便なプロセスで安価に合成可能な人工分子認識材料の創出が期待されている．

1･2 人工抗体：分子インプリントポリマー（MIPs）

分子インプリンティングは，テーラーメイドに標的分子に対する分子認識空間を高分子材料中に構築する技術であり，得られる分子インプリントポリマー（Molecularly imprinted polymers, MIPs）は，抗体に代わる人工分子認識材料（人工抗体）として高い可能性を秘めている．この技術は，鋳型重合の一種であり，まず，鋳型分子（標的分子あるいはその誘導体）とそれに対して相互作用可能なモノマー（機能性モノマー）を複合化する．この複合体形成は，可逆的共有結合や非共有結合，配位結合でも適用可能である．次に，コモノマーや架橋性モノマーを添加して重合を行うことで，複合体の周囲にポリマーマトリクスを形成する．この過程で標的分子に対する機能性モノマー由来の相互作用部位の空間配置がポリマーマトリクスにより固定化される．最後に，鋳型分子をポリマーマトリクスから除去することで，標的分子に対して相補的なサイズ及び官能基配置を有する分子認識空間がポリマーマトリクス内に形成される（Fig. 1）[8)~21)]．

この分子インプリンティング技術は，近年急速な進歩を遂げており，例えば，当研究室では，タンパク質生合成の過程である「翻訳後修飾」に発想を得て，MIPs 内に分子認識空間を形成後，その空間内に選択的な後天的修飾を行う「ポストインプリンティング修飾法」（Post-imprinting modification, PIM）を独自に考案した[22)~26)]．PIM により，分子認識空間内を選択的に化学修飾することで，分子認識能の改変や新たな機能の付与を実現し，最近では抗体と同等の認識能を示す MIPs の開発にも成功している[27)~34)]．また，不均一系高分子合成技術と組み合わせることで，様々なサイズを有する微粒子状 MIPs を創製できるようになり[35)~40)]，血中で分子認識能を発現することで，生体内その場で機能化するドラッグデリバリーキャリアの創出にも成功している[41)42)]．

1･3 精密分子認識空間構築戦略としての配向性分子インプリンティング

上述のように，生物由来の分子認識材料においては，モノクローナル抗体の誕生を機に，均一性が高く精密な分子認識を実現する扉が開かれた．では，人工抗体として期待される MIPs ではどうか？鋳型分子と機能性モノマーの複合体の存在下でラジカル重合を行う従来の分子インプリンティング技術では，激しく運動している複合体を，ラジカル重合で形成されるポリマーマトリクスにより，溶液中で捕捉するため，MIPs 内の分子認識空間の形成場所は，完全にランダムであり，アクセシビリティはそれぞれの分子認識空間で異なる．すなわち，従来の分子インプリンティング技術では，ポリマー材料中に形成される分子認識空間が不均一になることは避けられない．したがって，この不均一性に起因する低親和性分子認識空間の形成や，それに伴う非特異吸着などが生じる．

このような不均一性分子認識空間の形成をできるだけ低減させるための方法論として，本稿では，「配向性分子インプリンティング技術」について概説する（Fig. 2）．この配向性分子インプリンティングの実現には以下の二つの要素が必須である．（1）鋳型分子の配向固定化技術：センサ基板上に均一性の高い分子認識空間を形成するためには，鋳型分子の分子運動を抑えつつ，相互作用部位の向きを揃えてセンサ基板上に固定化する必要がある．配向固定化することにより，分子認識空間中の相互作用部位の空間的配置の均一性が高くなり，非特異的吸着が抑制され，高い分子認識能の発現につながる．（2）ポリマー膜厚制御技術：センサ基板上に鋳型分子を配向固定化したのち，ポリマーマトリクスを形成させるが，鋳型分子が埋もれてしまっては意味がない．鋳型分子の除去及び除去後に形成される分子認識空間への標的分子のアクセスを可能にするため，ポリマー膜厚の厳密な制御が重要である．これを達成するために，高分子精密合成が可能な制御/リビングラジカル重合を用いる．制御/リビングラジカル重合は，活性種とドーマント種間の平衡反応を利用することで，ラジカル重合における最も重要な副反応である停止反応を抑制しながら，ポリマーを生長させることができる方法であり，分子量分布の狭い分子量の規定されたポリマーを得ることができる方法として，急速な発展を遂げている[43)~49)]．MIPs をセンサに応用する場合，重合開始基をセンサ基板表面に修飾し，その開始基を起点として重合を開始することで，膜厚の制御されたグラフト MIPs をボトムアップ式に簡便にセンサ基板上に形成できる．

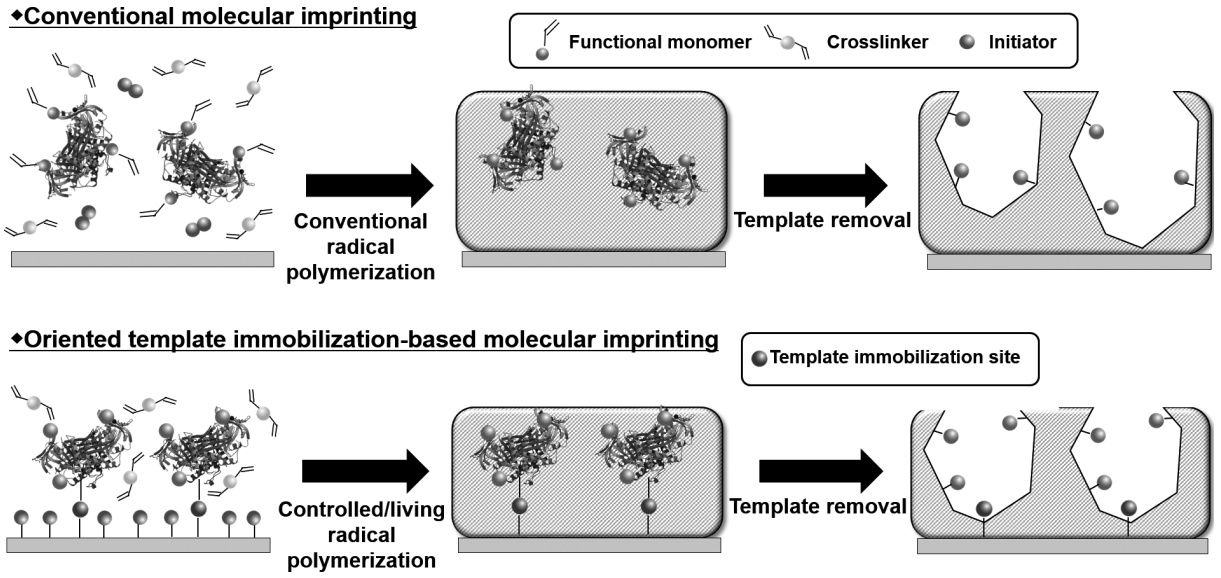

Fig. 2　Schematic illustrations of conventional molecular imprinting and orientational molecular imprinting

以下に，著者らが最近報告した精密分子認識空間構築戦略としての配向性分子インプリンティングについて，低分子化合物からタンパク質まで応用した例について紹介し，その有用性について概説する．

2　ストレスマーカー：コルチゾール

2･1　ストレスマーカーの認識

現代の複雑な社会環境の下で生活している我々は，常に様々かつ複雑なストレス要因に曝されており，うつ病やクッシング症候群等の精神疾患を発症するリスクが高い状況にある．厚生労働省によるうつ病患者数の推移統計では平成8年に約41万人であった患者数が，平成20年には100万人以上と明確に増加している．そのため，最近では自身のストレス状態を客観的に把握する簡便なストレスチェックによる自己管理の重要性が増している．

コルチゾールはステロイド骨格を有しており，副腎皮質から分泌されるホルモンとして知られる．そのため最近ではうつ病等の精神疾患の早期発見につながることからコルチゾールをストレスマーカーとして高感度かつ簡便に検出するための研究が盛んに行われている[50)～52)]．

現在のコルチゾールの測定方法として一般的に用いられるのは酵素免疫測定法（Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）である．しかしながら，ELISAでは高価かつ不安定な抗体を利用する必要があると同時に，測定プロセスが煩雑であることから，自己管理のためのストレスチェックに用いることは困難である．そこで，ELISAに代わるコルチゾールの簡便な測定方法の開発が望まれている．コルチゾールは，血液中だけでなく唾液中にも2～20 nMの濃度で分泌されることがわかっており，自身で非侵襲的にサンプリング可能な唾液サンプルで検出できれば，ストレスの自己管理実現に大きく近づく．

2･2　従来MIPsによるコルチゾール検出

著者らは，これまでにMIPsを用いたコルチゾールの検出について一連の報告を行ってきた．まず，従来の分子インプリンティング技術によりMIP微粒子を作製し，競合法によってコルチゾールの検出を行った[53)54)]．鋳型分子としてコルチゾールの21位ヒドロキシ基をメタクリル酸のエステルとしたメタクリロイル化コルチゾール，機能性モノマーとしてイタコン酸，コモノマーとしてスチレン，架橋剤としてジビニルベンゼンを用い，ポリ（スチレン−ジビニルベンゼン）をシード粒子としたシード重合により，シェル層にコルチゾール認識空間を有するMIP微粒子を合成した．動的光散乱法によって算出した粒子径は約200 nmで，得られた微粒子は，クロロホルム/ヘキサン（4:1 v/v）混合溶媒中で良好な分散安定性を示した．

標的分子であるコルチゾールの蛍光検出を行うために，ダンシル基を修飾したダンシル修飾コルチゾールを合成し，これを用いた競合法によりコルチゾール蛍光偏光解消による高感度検出を試みた．本センシングシステムでは，ダンシル修飾コルチゾールがMIP微粒子と相互作用すると，ダンシル修飾コルチゾールの分子運動が抑制されるため，蛍光偏光測定における異方性が上昇する．遊離のコルチゾールが存在するとダンシル修飾コルチゾールと競合し，その結果，ダンシル修飾コルチゾールが脱着すると，異方性が減少する．実際，ダンシル修飾コルチゾールに対してMIP微粒子を滴定したところ，濃度に依存して異方性が上昇したことから，ダンシル修飾コルチゾールがMIP微

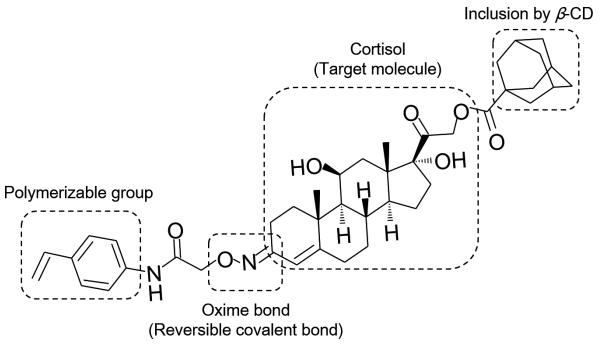

Fig. 3 Designed cortisol-derivative as a template molecule for orientational molecular imprinting

Adapted from ref. 55 with permission from The Royal Society, copyright 2017.

粒子に対して相互作用することが示された.

一定量のダンシル修飾コルチゾール存在下，種々の濃度のコルチゾールを滴下したところ，濃度に依存して異方性が少しずつ減少し，競合法による蛍光偏光解消によるコルチゾールの検出が可能であることが示された．また対照物質テストステロン及びプロゲステロンに対しては応答が低く，コルチゾールに対する選択性の発現を確認した．残念ながら，本方法における検出限界は 80 nM と推定され，唾液中のコルチゾール測定に対しては不十分な検出能であった.

2･3 コルチゾールの配向性分子インプリンティング

著者らは，MIPs を利用したコルチゾールのさらなる高感度検出を試みるため，配向固定化コルチゾールを利用した精密分子認識空間を有する MIP 薄膜の構築を試みた[55]．ここでは，アダマンタンと β-シクロデキストリン（β-cyclodextrin, β-CD）の相互作用を利用することで，鋳型コルチゾールを配向固定化した．まず，コルチゾールの 3 位のケトンにオキシム結合を介して重合性官能基を導入し，21 位の水酸基にアダマンタンカルボン酸を導入し，鋳型コルチゾールを合成した（Fig. 3）．金をスパッタリングした基板上に，ブロモ基（重合開始基）及び β-CD を末端にもつ混合自己組織化単分子膜（mixed self-assembled monolayer, mixed SAM）を作製した．次に，鋳型コルチゾールを添加し，鋳型コルチゾールのアダマンタン部位と mixed SAM 上の β-CD を相互作用させることで配向固定化した．そこに，コモノマーとして，生体適合性が高く非特異的吸着の生じにくい 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, MPC）を添加し，表面開始原子移動ラジカル重合（surface-initiated activator generated by electron transfer for atom transfer radial polymerization, SI-AGET ATRP）によりポリマー薄膜を形成した．MPC ポリマーマトリクスの形成は，X 線光電子分光法（X-ray photoelectron spectroscopy, XPS）における P 2p 軌道の出現によって確認した．また，X 線反射率法（X-ray reflactivity, XRR）によって MPC ポリマー膜厚を測定したところ，重合時間に対して膜厚がおおよそ直線的に増加していたことから，制御/リビングラジカル重合が進行していることを確認した．重合後，オキシム結合を加水分解し，有機溶媒洗浄によりアダマンタンと β-CD を解離することで，鋳型コルチゾールをポリマー内から除去し，コルチゾールの配向認識空間を有する MIP 薄膜を合成した．このコルチゾール認識空間の一端にはアミノオキシ基が，もう一端（基板上）には β-CD が配置されており，アミノオキシ基はコルチゾールの 3 位のカルボニル基と相互作用し，逆末端の β-CD はステロイド骨格の D 環を包接する 2 点相互作用でコルチゾールを選択的に認識するように設計した（Fig. 4）.

コルチゾールの検出は，蛍光性競合分子を用いた競合法を用いて行った．蛍光性競合分子として，エストロゲンレセプターに結合することが知られるビスフェノール A（Bisphenol A, BPA）にフルオレセインを修飾した誘導体分子（FITC-BPA）を合成した.

基板上に構築した MIP 薄膜に一定量の FITC-BPA の共存下，種々の濃度の遊離コルチゾールを添加し，添加前後における溶液中の蛍光強度変化を測定したところ，遊離コルチゾールの添加濃度の増加に伴い，溶液中の FITC-BPA 由来の蛍光強度変化が増大し，競合法によってコルチゾール結合情報が読み取れることが明らかになった．その際得られたコルチゾールの MIP 薄膜への見かけの結合定数（K_a）は 1.3×10^{11} M^{-1}，検出限界は 7.7 pM と算出され，唾液中のコルチゾールが測定可能なほどの高感度検出を達成した．また，この MIP 薄膜のコルチゾールの構造類似体である 17β-エストラジオール , コレステロール，テストステロン，プロゲステロンに対する応答は，コルチゾールよりも明らかに低く，MIP 薄膜はコルチゾールを選択的に認識していることが示された.

2･4 配向性分子インプリンティングの有用性

配向性分子インプリンティング技術が，MIP 薄膜のコルチゾール高感度検出に与える影響について確認するため，種々の対照ポリマーを作製し，コルチゾール検出実験を行った．(1) 鋳型コルチゾール不在下で作製したポリマー薄膜（ノンインプリントポリマー : NIP，相互作用部位である β-CD 及びアミノオキシ基は含む）では，コルチゾールに対する応答が極めて低く，親和性が低いことがわかった．(2) コルチゾール認識部位として β-CD あるいはアミノオキシ基のどちらかを有する対照ポリマー薄膜（RP-β-CD 及び RP-oxime）は，両者ともに MIP 薄膜に比べてコルチゾールに対する結合定数は低下していた．このこ

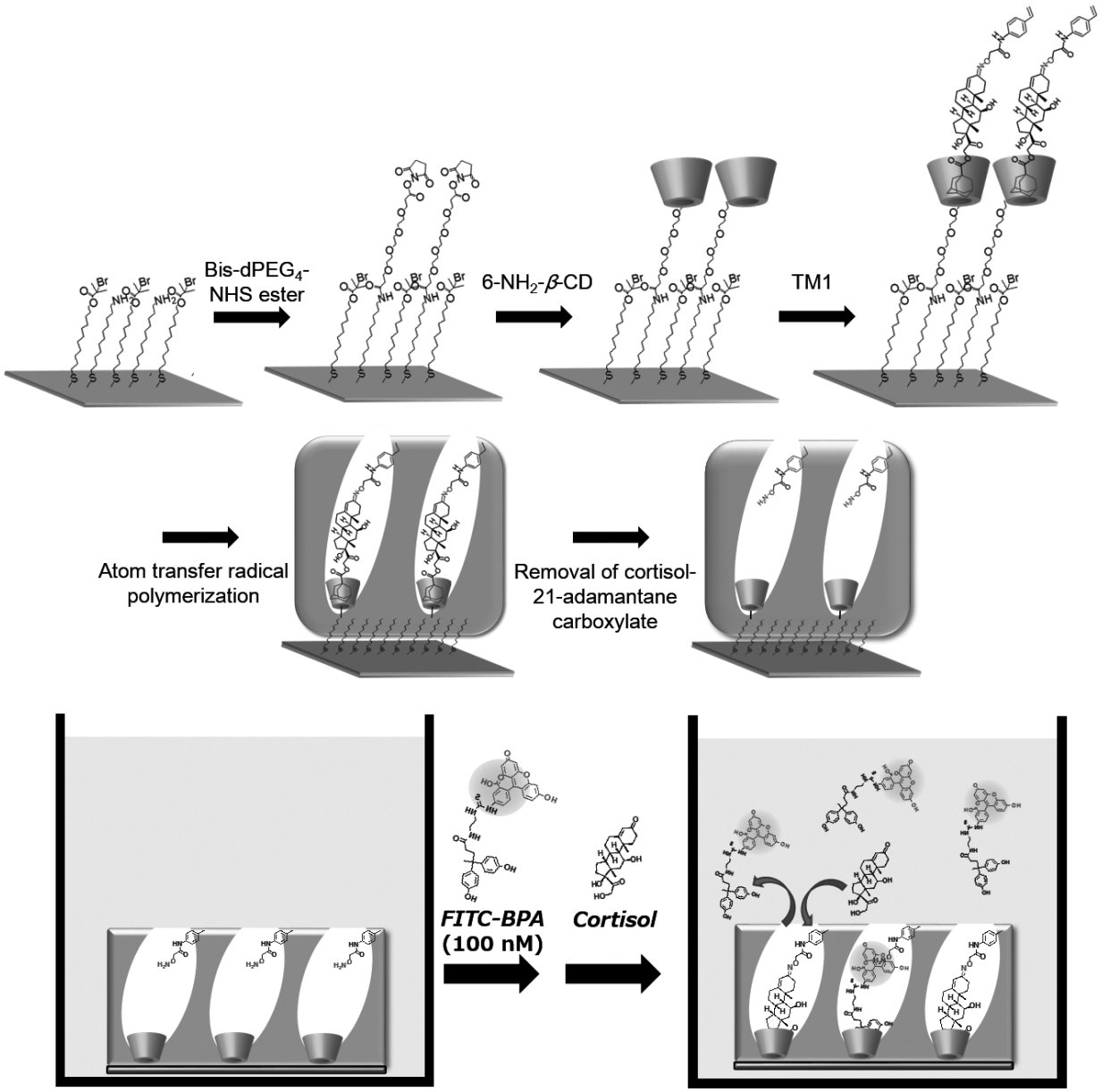

Fig. 4　Schematic illustration of the orientationally fabricated molecular imprinting of stress marker cortisol and fluorescent detection based on a competitive binding assay

Adapted from ref. 55 with permission from The Royal Society, copyright 2017.

とから，β-CD 及びアミノオキシ基による多点相互作用によってコルチゾールを検出する有効性が示された．(3) さらに，β-CD を金基板上に固定化する代わりに，6-methacryloyl-β-CD を用いることで，鋳型コルチゾールを配向固定化しない MIP 薄膜（R-MIP）を作製し，分子認識空間の配向性の効果について検討した．その結果，配向性を有する MIP 薄膜のほうが有意に高い結合親和性を示し，鋳型コルチゾールの配向固定化が有用であることが示された．また，MIP 薄膜と同様，対照ポリマーに対しても選択性実験を行った結果，MIP 薄膜のみが高いコルチゾール選択性を示した（Fig. 5）．これらの結果より，コルチゾールに対する高感度検出には，MIP 薄膜中の 2 点認識及び配向性の両者が重要であることが明確に示された．

2･5　架橋性コルチゾール MIP 薄膜の調製と実サンプルへの応用

重合時に親水性架橋剤，*N*,*N*'-メチレンビスアクリルアミド（*N*,*N*'-methylene-bis-acrylamide, MBAA）を加えて，分子認識空間を構築した結果，見かけの結合定数（K_a）は 2.3×10^{11} M^{-1}，検出限界は 4.8 pM となり，より高感度検出が可能となった．また，選択性実験の結果，架橋性 MIP 薄膜のほうが高いコルチゾール選択性を示したことから，架

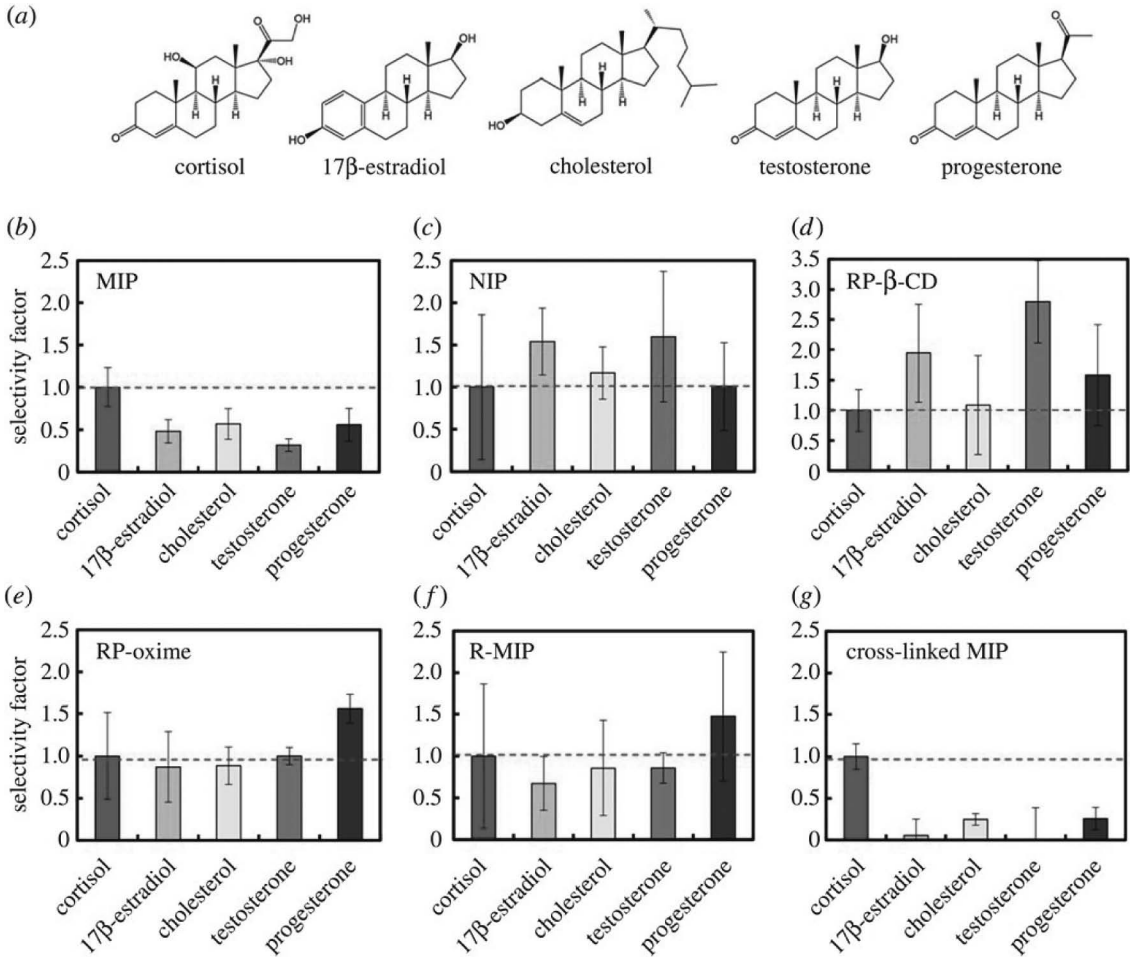

Fig. 5 Cortisol selectivity test using MIPs and various reference polymers
Adapted from ref. 55 with permission from The Royal Society, copyright 2017.

橋剤の導入により高感度・高選択性をもつ MIP 薄膜が得られることが明らかとなった．これは，MIP 薄膜を架橋することにより，コルチゾール認識空間がより厳密にポリマーマトリクス内に保存されたためと考えられる．過度の架橋はコルチゾール認識空間へのアクセシビリティを阻害すると考えられることから，10 % から 20 % の架橋度が適切であると考えられる．

この架橋性 MIP 薄膜を用いて，唾液実サンプル中のコルチゾール検出を試みた．唾液採取キットを用いてヒトから採取した唾液実サンプルを 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）を用いて 10 % まで希釈した唾液サンプル中にスパイクしたコルチゾールの検出を試みた．その結果，結合定数（K_a）が 4.5×10^{10} M^{-1} であり，唾液成分が含まれた溶液中においても十分に高い親和性を保っていた．検出限界を見積もったところ，唾液実サンプル中においても 10 pM 以下の値を示していた．このことから，本研究において開発した配向性分子認識空間を有する MIP 薄膜を用いたコルチゾール検出法は，唾液実サンプル中においても十分に機能することが明らかなり，今後，ストレスと MIP 薄膜のレスポンスの関係を検証することで，ストレスを非侵襲で評価するセンサへの展開が期待される．

3 がんマーカータンパク質：グルタチオン-*S*-トランスフェラーゼ-π（GST-π）

3･1 がんマーカータンパク質の認識

現在，死亡原因の第 1 位は悪性新生物（がん）であり，がんの早期診断を実現できれば，医療費の削減や患者の QOL の改善に大きく貢献できることから高い注目を集めている．生体内で疾病が生じると，その疾病に応じた特定のタンパク質の体液濃度が上昇することが知られており，このタンパク質はバイオマーカータンパク質と呼ばれる．このバイオマーカータンパク質の体液濃度変化を鋭敏に検出することにより，がんの早期診断を実現できる可能性があるため，バイオマーカータンパク質の高感度検出法の確立が望まれている．

グルタチオン-*S*-トランスフェラーゼ-π（Glutathione-s-transferase-π, GST-π）は，解毒，代謝及び酸化ストレスなどの生体機能に大きく関与していることがわかっている酵

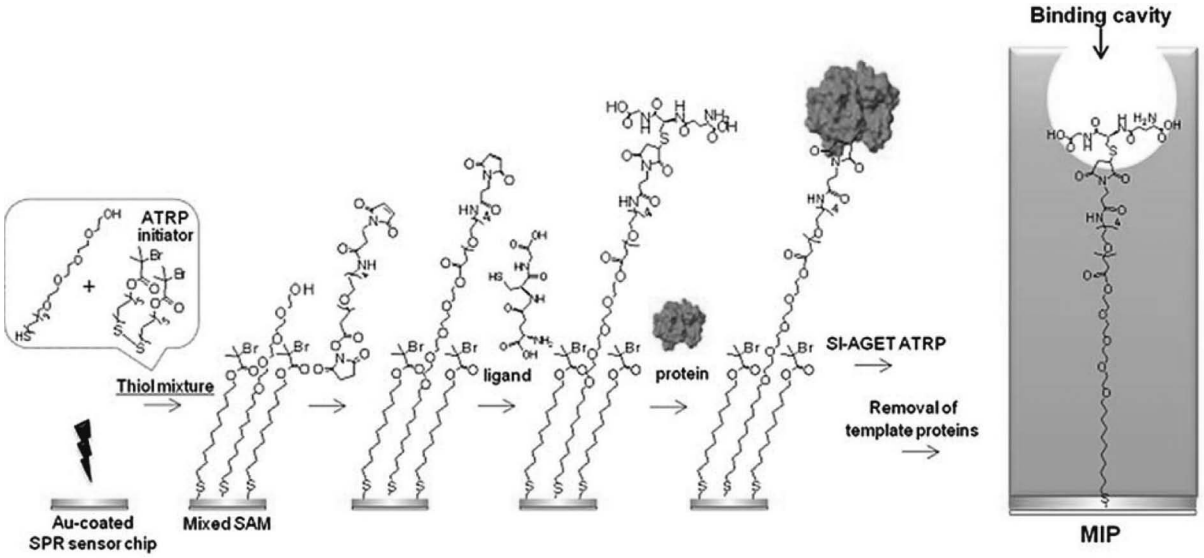

Fig. 6　Fabrication of orientational molecular imprinting for cancer biomarker protein recognition nanocavities utilizing protein-ligand interaction

Adapted from ref. 57 with permission from The Royal Society of Chemistry, copyright 2014.

素の一つであり，発がん性物質や毒性化合物に対抗する役割を果たす．このような機能を有するため，がんや白血病患者の血中レベルが増加するバイオマーカータンパク質として知られており，GST-π の高感度検出を行うことで，がんの早期診断につながることが期待される[56]．

3･2　特異リガンドを用いたがんマーカータンパク質の配向性分子インプリンティング

著者らは，GST-π の高感度検出を実現するため，配向性分子認識空間を有する MIP 薄膜を構築した．配向性分子認識空間の構築には，鋳型 GST-π をセンサ基板上に配向固定化する必要がある．本研究では，この配向固定化のためにタンパク質−リガンド相互作用を利用した．GST-π は二つのサブユニットから形成されるホモダイマーであり，それぞれのサブユニットには特異リガンドであるグルタチオン（Glutathione, GSH）に対する結合サイト（G サイト）を有している．そこで，GSH をセンサ基板上に修飾し，GST-π を表面に配向固定化することを試みた[57]（Fig. 6）．

GSH をシステイン残基の遊離チオールを介して表面プラズモン共鳴（Surface plasmon resonance, SPR）センサ基板上に固定化するためのマレイミド基と重合開始基であるブロモ基を有する mixed SAM を形成し，GSH をマイケル付加反応により固定化した．この遊離のチオール基は GST-π との相互作用にほとんど関連しないことがわかっていることから，固定化に利用してもリガンドとしての機能は失わない．GST-π を添加して配向固定化したのちに，ポリマーマトリクスを形成するためのコモノマーとして，2-ヒドロキシエチルメタクリレート（2-Hydroxyethyl methacrylate, HEMA）を選択し，SI-AGET ATRP によりポリマー薄膜を形成した．ポリマー薄膜の形成について，XRR による膜厚測定によって解析したところ，重合時間に依存してポリマー膜厚が増大することが示され，重合時間によって膜厚を制御できることが明らかになった．MIP 薄膜を形成後，SPR によって GST-π に対する結合能をスキャッチャード解析で評価したところ，K_a が 6.4×10^6 M^{-1} と推定された．この値は，鋳型 GST-π を添加せずにポリマー薄膜を形成したノンインプリントポリマー（NIP-GSH）や GST-π と GSH の両者の不在下で重合したポリマー薄膜（NIP-noGSH）の結合定数に比べて有意に高い値を示し，分子インプリント空間の構築が GST-π に対する親和性を向上させていることが示された．さらにヒト血清アルブミンやフィブリノーゲンを対照タンパク質として用いた選択性実験を行った結果，GST-π に対する高い選択性が示された．

3･3　膜厚制御の重要性

制御/リビングラジカル重合を用いてボトムアップ的にポリマー薄膜を形成する場合，重合時間やモノマー濃度によってポリマー膜厚を制御できるため，センサ基板表面に固定化した鋳型分子のサイズに最適な膜厚のポリマー薄膜を形成できる．そこで，ポリマー膜厚最適化の重要性を調査するために，重合時間が 0～3 時間の MIP 薄膜に対して選択性評価を行った．重合時間が 0 時間でありポリマー薄膜を形成しない場合（固定化 GSH のみ）は，対照タンパク質に対する非特異吸着が生じ，GST-π に対する選択性は低かった．また，重合時間が 3 時間の MIP 薄膜（ポリマー

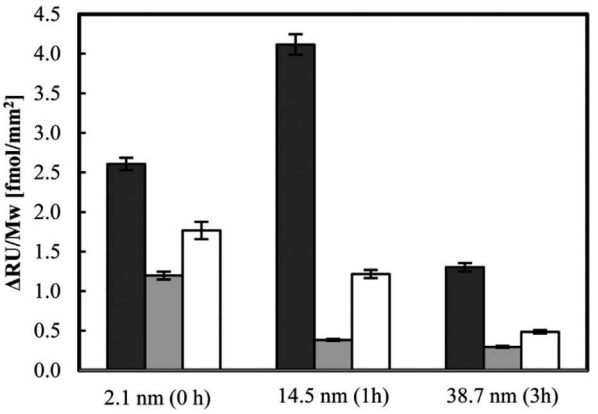

Fig. 7 GST-π selectivity test with MIPs bearing different polymer thicknesses (Black, GST-π; Gray, HSA; White, Fibrinogen)

Adapted from ref. 57 with permission from The Royal Society of Chemistry, copyright 2014.

膜厚 38.7 nm）は，比較的良好な選択性を示したが，GST-π の吸着量は低減した．これは，ポリマー膜厚が大きい場合は分子認識空間への GST-π のアクセスが阻害されるためであると考えられる．一方，重合時間が 1 時間の場合（ポリマー膜厚 14.5 nm），高い GST-π 吸着量を示すと同時に最もよい選択性を示した．これは，GST-π のサイズにフィットした分子認識空間の形成は，ポリマー膜厚に依存し，膜厚の最適化は，特異リガンドを用いたがんマーカータンパク質の配向性分子インプリンティングにおいて極めて重要な因子であることがわかった（Fig. 7）．

さらに高選択的な GST-π 認識を達成するために，MIP 薄膜を構成するポリマーマトリクスの影響を調べた．非特異的吸着が疎水性相互作用に起因すると想定して，これまで使用していた HEMA に代えてより親水性の高い *N*-[トリス（ヒドロキシメチル）メチル]アクリルアミド（*N*-Tris [(hydroxymethyl)methyl] acrylamide, THMA）を用い，GST-π に対する認識能を評価した．その結果，THMA を用いたほうがより高い GST-π 選択性を示すことがわかった．親和性はすなわち，分子認識空間を形成するポリマーマトリクスの特性も MIP 薄膜の性能に影響を与えることがわかった．以上のことから，配向制御された分子認識空間を構築する際の重要な因子として，ポリマー膜厚及びポリマーマトリクスの特性に着目し，これら最適化することで，特異リガンドを用いたがんマーカータンパク質の配向性分子インプリンティングにより，がんマーカータンパク質を高感度に検出するための MIP 薄膜が調製可能であることが示された．

4　血管内皮細胞増殖因子 : VEGF

4･1　血管内皮細胞増殖因子アイソフォームの認識

血管内皮細胞増殖因子（Vascular endothelial growth factor, VEGF）は細胞膜上に発現する VEGF レセプターに結合することで血管新生を促すタンパク質である．がん患者では，悪性腫瘍が血管新生を亢（こう）進することから VEGF 血中濃度が増大することが知られている．そのため，VEGF の高感度検出は，がん早期診断や経過観察に重要な役割を果たす．さらに，VEGF ファミリーは，異なる遺伝子によりコードされた種々のアイソフォームを有し，それぞれのアイソフォームにおいても，スプライシングの違いによるサブタイプが存在することが知られる．VEGF-A には，主に 3 種のアイソフォーム VEGF 165，VEGF 189 及び VEGF 121 が存在し，特に VEGF 165 と VEGF 189 は 89 % という極めて高い相同性を有している．さらに，VEGF 165 及び VEGF 189 は，特異リガンド分子であるヘパリンを結合するヘパリン結合ドメインを有している一方で，VEGF 121 はそれを有していない．このような VEGF のアイソフォームは，生体内で様々な役割を果たし，がんが生じた際にはそれぞれの産生量が異なってくる．そのため，特定 VEGF アイソフォームの高感度かつ高選択的検出は，がんの早期診断のために極めて重要である[58)59)]．特に，VEGF 165 は，早期の血管新生時に産生され，直腸がんにおいて顕著である．しかしながら，高い相同性を示すアイソフォームタンパク質を精密に認識するためには，それを可能にするモノクローナル抗体の産生が必須であり，複雑かつ長時間のプロセスが必要となる．したがって，ここでも，容易に調製が可能なアイソフォームタンパク質を認識する人工分子認識材料が求められている．

4･2　特定アイソフォームを認識するための配向性分子インプリンティング

当研究室では，高い相同性を示すアイソフォームタンパク質を精密に認識するために，配向性分子インプリンティングによる厳密な認識能を有する MIP 薄膜の調製を試みた[60)]（Fig. 8）．まず，SPR センサチップ上にヘパリンを固定化し，続いて VEGF 165 を添加して，ヘパリン結合ドメインを介して配向固定化する．VEGF 165 と相互作用が可能なメタクリル酸（Methacrylic acid, MAA）を機能性モノマーとして用いた配向性分子インプリンティングを行うことで，形成される VEGF 165 認識空間内に特異リガンドヘパリンとメタクリル酸残基が存在する多点認識可能な配向性分子認識空間を構築した．まず，ヘパリンの還元末端をチオール化した．マレイミド基とブロモ基をもつ mixed SAM 膜が形成された SPR センサ基板を作製し，このマレイミド基を介して，ヘパリンを固定化した．鋳型分子

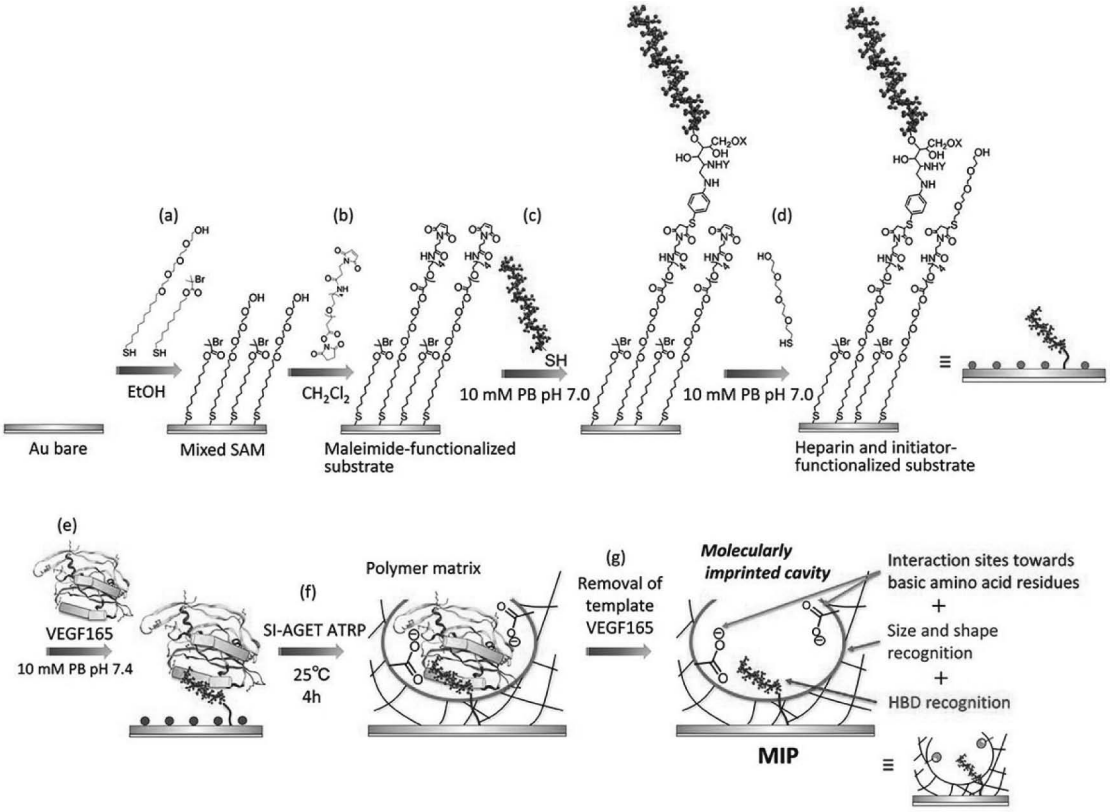

Fig. 8　Orientational molecular imprinting for VEGF isoform recognition nanocavities with a heparin-immobilized sensor chip

Adapted from ref. 60 with permission from American Chemical Society, copyright 2018.

VEGF165 を添加して配向固定化し，機能性モノマー MAA，コモノマー MPC，親水性架橋剤として MBAA を添加後，SI-AGET ATRP によりポリマーマトリクスの形成を行った．VEGF 165 のサイズは約 6.4 nm であるため，重合時間と温度を制御することにより，ポリマー膜厚を約 7 nm に調整した．得られた MIP 薄膜の VEGF 165 に対する認識能を評価したところ，VEGF 165 に対する K_a は 2.9×10^8 M^{-1} であり，MIP 薄膜を形成することで VEGF 165 に対する親和性が増大した（ポリマー形成前の K_a は 1.4×10^7 M^{-1}）．一方で，鋳型分子不在下で合成した NIP 薄膜では，ほとんど VEGF 165 に対する結合を示さなかったことから，配向性分子インプリンティングによる分子認識空間形成が VEGF 165 の認識には不可欠であることがわかった．

ヘパリンと MAA の協奏的多点認識能を評価するため，MAA を用いずに作製した対照 MIP 薄膜の VEGF 165 に対する分子認識能を評価したところ，K_a が 2.5×10^7 M^{-1} であり，MAA をもつ MIP 薄膜より親和性が劣った．すなわち，特異リガンドのヘパリンと MAA による多点相互作用が高親和性を生み出していることが明らかとなった．

さらに，VEGF アイソフォームに対する選択性について評価したところ，ポリマー薄膜を構築していないヘパリン固定化基板においては，VEGF 165 及び VEGF 189 の選択性は見られないだけでなく，センサ基板上への非特異吸着が生じてしまうために VEGF 121 の吸着も見られた．一方で，結合空間内に MAA をもたない対照 MIP 薄膜においては，VEGF 121 の非特異吸着は明確に抑制されたものの，ヘパリン結合ドメインを有する VEGF 165 及び VEGF 189 の選択性は有していなかった．しかし，ヘパリンと MAA による多点相互作用が可能な MIP 薄膜においては VEGF 165 に対する選択性が発現した．このことから，VEGF 165 認識空間内のヘパリンは VEGF 165 のヘパリン結合ドメインを認識し，MAA は主にサイズ認識に寄与していることが推察される．相互作用機序の異なる結合部位を有する配向性分子認識空間は，高い相同性を有するアイソフォームタンパク質でさえ認識可能であることが実証された（Fig. 9）．

5　糖タンパク質：オボアルブミン

5･1　糖タンパク質の認識

翻訳後修飾で糖鎖が付加されたタンパク質は糖タンパク質と呼ばれ，生合成されるタンパク質の約 50 % 以上を占める．タンパク質への糖鎖の付加は，タンパク質の溶解性や安定性を向上させるだけでなく，細胞間相互作用やシグナル伝達などの生体内コミュニケーションに大きく関連し

ている[61)~64)]．オボアルブミン（Ovalbumin, OVA）は，卵白中の54 % を占め，アスパラギン酸残基に*N*-グリコシド結合で1分子の枝分かれ糖鎖が結合している糖タンパク質の一種として知られる．さらに，三大食品アレルゲンの一つである卵の主要アレルゲンであることが知られており，食品中のOVAの検出はELISA法など様々な方法が報告されている[65)]．

近年，アレルゲンの正確な検出は病院や診療所などの医療機関だけでなく，食品へのアレルゲン混入を防ぐため食品関連企業においての需要が高まっている．さらには，アレルギー症状の重篤さから，意図せぬアレルゲン混入による食物アレルギー事故の予防のために，飲食店や一般家庭における簡易診断の需要も増えつつある．実際，食品衛生法関連法令改正に伴い特定原料の表示が義務付けられ，アレルゲンの有無についての情報の重要性が高まっている．

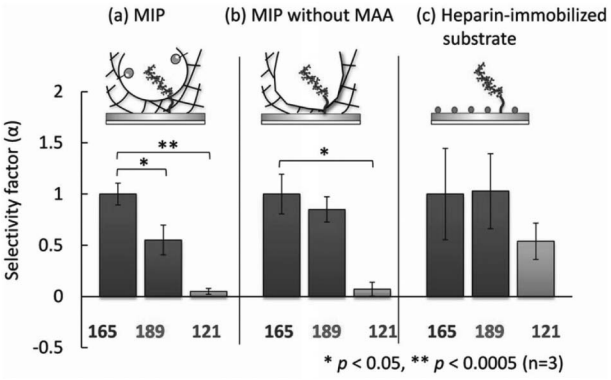

Fig. 9 VEGF isoform selectivity test of MIPs substrates bearing dual (left) and single (center) interactions site and a heparin-immobilized substrate (right)

Adapted from ref. 60 with permission from American Chemical Society, copyright 2018.

5･2 糖−ボロン酸結合による糖タンパク質の配向性分子インプリンティング

最近，糖タンパク質の検出にボロン酸を用いた研究が多数報告されている．ボロン酸は，糖鎖中の*cis*-diol基と可逆的な環状ジエステルを形成するため，糖タンパク質の検出に適しているが，多くの糖鎖と結合してしまうため，特定の糖タンパク質を認識することは困難である．

著者らは，糖タンパク質OVAに対する精密な認識を実現するため，糖−ボロン酸結合を用いる配向性分子インプリンティングにより，OVAのMIP薄膜の構築を試みた[66)]（Fig. 10）．SPRセンサチップ上にフルオロフェニルボロン酸基とATRP開始基であるブロモ基を有するmixed SAM膜を形成し，フルオロフェニルボロン酸基とOVAの糖鎖を環状ジエステル形成させることにより，OVAを配向固定化した．事前に，フルオロフェニルボロン酸基とOVA環状ジエステル形成の最適なpHを検討したところ，pH 7.4において最も良好なOVA固定化が観察されたことから，この条件でOVAを固定化した．機能性モノマーとしてピロリジルアクリレート（Pyrrolidyl acrylate, PyA），ポリマーマトリクスを形成するコモノマーとしてはMPCを用

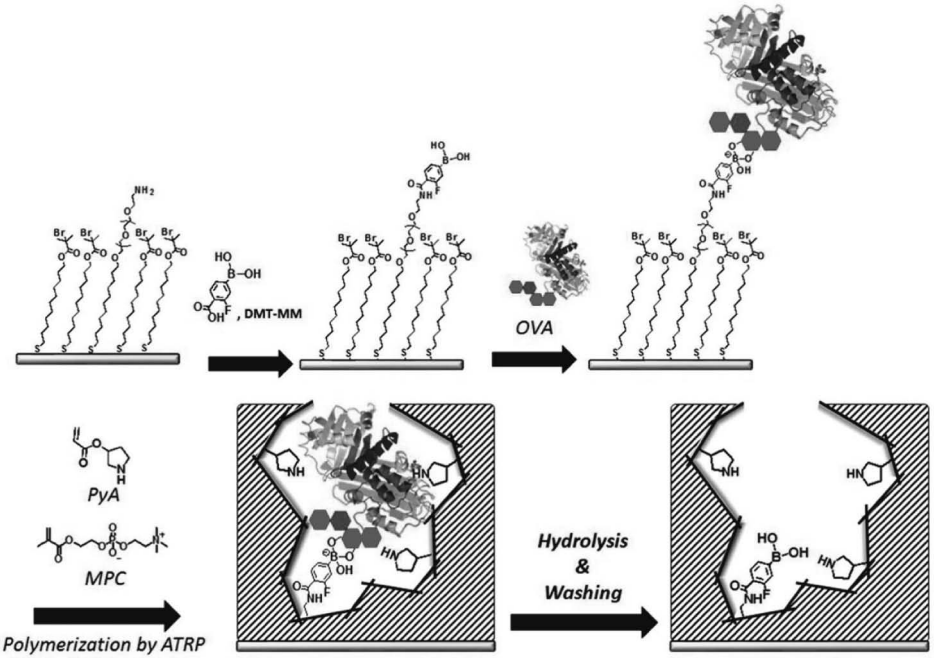

Fig. 10 Orientational molecular imprinting for glycoprotein recognition nanocavities via boronate ester formation for the orientational immobilization of template glycoprotein

Adapted from ref. 66 with permission from American Chemical Society, copyright 2018.

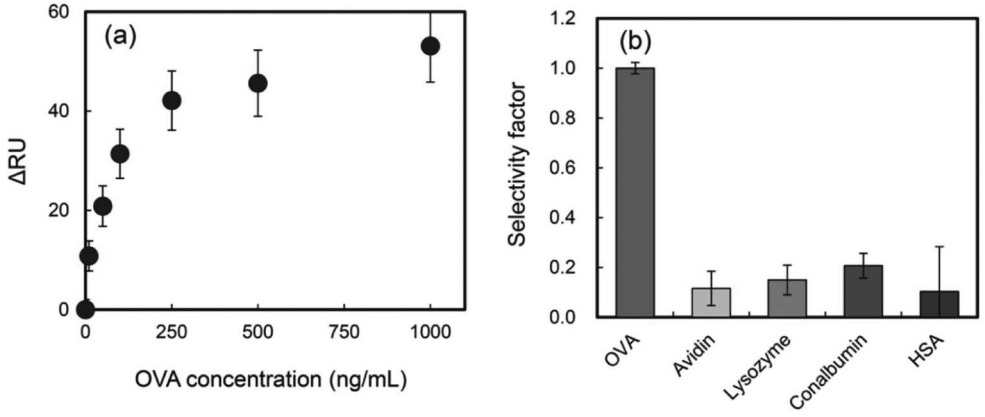

Fig. 11　Affinity and selectivity of orientationally fabricated MIP thin layer toward the target glycoprotein
Adapted from ref. 66 with permission from American Chemical Society, copyright 2018.

いて，SI-AGET ATRP によりポリマー薄膜を形成した．ポリマー薄膜の膜厚は，重合時間に従い直線的に増大し，重合が制御/リビングラジカル重合の機構により進行していることを確認した．

得られた MIP 薄膜に対する OVA 結合挙動を SPR によって評価したところ，濃度上昇に伴い OVA 吸着量が増大し，その結合定数は鋳型 OVA 不在下で重合した対照ポリマー NIP に比べて高い値を示した．さらに，卵白中に含まれるアビジン，コンアルブミン，リゾチーム及びヒト血清アルブミンを対照タンパク質として用いた選択性実験を行ったところ，これらすべての対照タンパク質に比べて OVA は明らかに高い結合量を示したことから，MIP 薄膜が糖タンパク質である OVA に対する高い認識能を示した．さらに膜厚の影響を確認するため，OVA サイズに適した膜厚に最適化した MIP 薄膜は，最適化前の MIP 薄膜に比べて結合定数が明らかに向上し，同時に選択性も大幅な改善が見られた（Fig. 11）．

実サンプルにおいても，作製した MIP 薄膜が機能するかどうかを確認するため，卵白サンプル中における OVA の添加回収実験を試みたところ，緩衝液中と同様の OVA 吸着等温線を得ることができたことから，卵白マトリクス中においても OVA 認識を実現できることを明らかにした．以上のこととから，糖タンパク質を，ボロン酸を介して配向固定化し，制御/リビングラジカル重合による厳密なポリマー膜厚制御による精密な分子認識空間構築を行うことにより，標的糖タンパク質に対する高い分子認識能を示す MIP 薄膜を構築することが明らかとなった．

6　おわりに

本稿では，重合時の鋳型分子と機能性モノマー複合体の配向を制御し，分子認識空間の均一性を向上させることで，標的分子に対して高い選択性と親和性を有する分子認識空間を創製する方法として，配向性分子インプリンティング技術に関する一連の研究についてまとめ，低分子化合物からタンパク質に至るまで，様々な標的分子に対する精密分子認識空間構築の例について紹介した．モノクローナル抗体の誕生を契機に，これまでに精密な分子認識を通して様々な学問や産業が発展してきた．しかし，生体を用いて合成される抗体にも限界があり，例えば抗体で糖鎖の厳密な認識は極めて困難である．MIPs は，そのような抗体に代わる（あるいは補完する）人工抗体の役割を果たすことが期待される．さらに，PIM による分子認識空間内特異的化学修飾により，MIPs の様々な高機能化を実現してきた．このような高機能化は，人工高分子材料であるがゆえに容易に実現可能であり，抗体をしのぐ高機能性分子認識材料へと発展しつつある．また，抗体と MIPs のハイブリッド化も進行している[67]．本稿でまとめた，配向性分子インプリンティングによる精密分子認識空間構築技術により，分子認識空間の均一化が達成され，MIPs の認識能は，飛躍的に向上した．現在までに，このアプローチは高感度センサ材料に応用されており，測定の自動化も成されている[67)68]．今後，本アプローチはセンサ基板材料だけでなく，微粒子材料へも応用が可能となり，高性能アフィニティ担体や人工抗体医薬などへの応用展開が考えられ，バイオテクノロジーからナノテクノロジーに至る広い範囲で波及効果が見込める．本稿が，今後の機能性人工分子認識材料創製の発展の一助となると幸いである．

謝　　辞

本稿で紹介した研究を協力して遂行していただいた神戸大学大学院工学研究科砂山博文氏，香門悠里氏，高野恵里氏，須田誠人氏，佐伯哲郎氏を始めとする研究室のメンバー各位に心より御礼申し上げます．本研究は，JSPS 科研費（JP24651261, JP15K14943, JP16K18300, JP18H05398）及びJSTマッチングプランナープログラム（MP27115663207, MP27115663368, MP28116808085）の助成の一部を用いて

行ったものです.

文　献

1) D. G. Deutsch, E. T. Mertz : *Science*, **170**, 1095 (1970).
2) J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage : *Nature*, **258**, 598 (1975).
3) A. K. Trilling, J. Beekwilder, H. Zuilhof : *Analyst*, **138**, 1619 (2013).
4) R. Karlsson, A. Michaelsson, L. Mattsson : *J. Immunol. Methods*, **145**, 229 (1991).
5) C. J. Barnstable, W. F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, A. F. Williams, A. Ziegler : *Cell*, **14**, 9 (1978).
6) G. P. Adams, L. M. Weiner : *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1147 (2005).
7) L. M. Weiner, R. Surana, S. Z. Wang : *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 317 (2010).
8) M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, H. Asanuma : "*Molecularly imprinting: from fundamentals to applications*", (Wiler-VCH, Weinheim), (2003).
9) T. Takeuchi, T. Hishiya : *Org. Bio. Chem.*, **6**, 2459 (2008).
10) K. Haupt : "*Molecular imprinting*", (Springer, Berlin), (2012).
11) L. X. Chen, S. F. Xu, J. H. Li : *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 2922 (2011).
12) S.-W. Lee, T. Kunitake : "*Handbook of molecular imprinting: advanced sensor applications*", (Pan Stanford Publishing, Singapore), (2013).
13) R. Schirhagl : *Anal. Chem.*, **86**, 250 (2014).
14) Z. J. Bie, Y. Chen, J. Ye, S. S. Wang, Z. Liu : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 10211 (2015).
15) T. Takeuchi, T. Hayashi, S. Ichikawa, A. Kaji, M. Masui, H. Matsumoto, R. Sasao : *Chromatography*, **37**, 43 (2016).
16) M. Panagiotopoulou, Y. Salinas, S. Beyazit, S. Kunath, L. Duma, E. Prost, A. G. Mayes, M. Resmini, B. T. S. Bui, K. Haupt : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 8244 (2016).
17) L. Uzun, A. P. F. Turner : *Biosens. Bioelectron.*, **76**, 131 (2016).
18) L. X. Chen, X. Y. Wang, W. H. Lu, X. Q. Wu, J. H. Li : *Chem. Soc. Rev.*, **45**, 2137 (2016).
19) R. R. Xing, S. S. Wang, Z. J. Bie, H. He, Z. Liu : *Nat. Protoc.*, **12**, 964 (2017).
20) J. M. Pan, W. Chen, Y. Ma, G. Q. Pan : *Chem. Soc. Rev.*, **47**, 5574 (2018).
21) M. Komiyama, T. Mori, K. Ariga : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **91**, 1075 (2018).
22) T. Yane, H. Shinmori, T. Takeuchi : *Org. Bio. Chem.*, **4**, 4469 (2006).
23) T. Takeuchi, N. Murase, H. Maki, T. Mukawa, H. Shinmori : *Org. Bio. Chem.*, **4**, 565 (2006).
24) H. Sunayama, T. Ooya, T. Takeuchi : *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 458 (2010).
25) T. Takeuchi, H. Sunayama, E. Takano, Y. Kitayama : "*Molecularly imprinted polymers in biotechnology*", eds. B. Mattiasson and L. Ye, Vol. 150, p. 95 (2015).
26) T. Takeuchi, H. Sunayama : *Chem. Commun.*, **54**, 6243 (2018).
27) K. Takeda, A. Kuwahara, K. Ohmori, T. Takeuchi : *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 8833 (2009).
28) Y. Suga, H. Sunayama, T. Ooya, T. Takeuchi : *Chem. Commun.*, **49**, 8450 (2013).
29) T. Takeuchi, T. Mori, A. Kuwahara, T. Ohta, A. Oshita, H. Sunayama, Y. Kitayama, T. Ooya : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 12765 (2014).
30) H. Sunayama, T. Ooya, T. Takeuchi : *Chem. Commun.*, **50**, 1347 (2014).
31) H. Sunayama, T. Takeuchi : *ACS Appl. Mat. Interfaces*, **6**, 20003 (2014).
32) R. Horikawa, H. Sunayama, Y. Kitayama, E. Takano, T. Takeuchi : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 13023 (2016).
33) H. Sunayama, T. Ohta, A. Kuwahara, T. Takeuchi : *J. Mat. Chem. B*, **4**, 7138 (2016).
34) H. Sunayama, Y. Kitayama, T. Takeuchi : *J. Mol. Recognit.*, **31**, e2633 (2018).
35) Y. Taguchi, E. Takano, T. Takeuchi : *Langmuir*, **28**, 7083 (2012).
36) E. Takano, F. Tanaka, T. Ooya, T. Takeuchi : *Anal. Sci.*, **28**, 457 (2012).
37) A. Uchida, Y. Kitayama, E. Takano, T. Ooya, T. Takeuchi : *RSC Adv.*, **3**, 25306 (2013).
38) K. Takimoto, E. Takano, Y. Kitayama, T. Takeuchi : *Langmuir*, **31**, 4981 (2015).
39) S. Nakai, H. Sunayama, Y. Kitayama, M. Nishijima, T. Wada, Y. Inoue, T. Takeuchi : *Langmuir*, **33**, 2103 (2017).
40) Y. Kitayama, K. Yoshikawa, T. Takeuchi : *Macromolecules*, **50**, 7526 (2017).
41) T. Takeuchi, Y. Kitayama, R. Sasao, T. Yamada, K. Toh, Y. Matsumoto, K. Kataoka : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, 7088 (2017).
42) S. Ichikawa, N. Shimokawa, M. Takagi, Y. Kitayama, T. Takeuchi : *Chem. Commun.*, **54**, 4557 (2018).
43) G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang : *Aust. J. Chem.*, **58**, 379 (2005).
44) S. Yamago : *Chem. Rev.*, **109**, 5051 (2009).
45) M. Kamigaito : *Polym. J.*, **43**, 105 (2011).
46) J. F. Lutz, M. Ouchi, D. R. Liu, M. Sawamoto : *Science*, **341**, 628 (2013).
47) P. B. Zetterlund, S. C. Thickett, S. Perrier, E. Bourgeat-Lami, M. Lansalot : *Chem. Rev.*, **115**, 9745 (2015).
48) M. Ouchi, M. Sawamoto : *Macromolecules*, **50**, 2603 (2017).
49) K. Matyjaszewski : *Adv. Mat.*, **30**, 1706411 (2018).
50) E. Aardal, A. C. Holm : *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **33**, 927 (1995).
51) R. Rosmond, M. F. Dallman, P. Bjorntorp : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 1853 (1998).
52) C. Kirschbaum, O. T. Wolf, M. May, W. Wippich, D. H. Hellhammer : *Life Sci.*, **58**, 1475 (1996).
53) N. Murase, S. Taniguchi, E. Takano, Y. Kitayama, T. Takeuchi : *J. Mat. Chem. B*, **4**, 1770 (2016).
54) N. Murase, S. I. Taniguchi, E. Takano, Y. Kitayama, T. Takeuchi : *Macromol. Chem. Phys.*, **216**, 1396 (2015).
55) N. Suda, H. Sunayama, Y. Kitayama, Y. Kamon, T. Takeuchi : *R. Soc. Open Sci.*, **4**, 170300 (2017).
56) J. Noguti, L. F. Barbisan, A. Cesar, C. D. Seabra, R. B. Choueri, D. A. Ribeiro : *In Vivo*, **26**, 647 (2012).
57) Y. Kamon, R. Matsuura, Y. Kitayama, T. Ooya, T. Takeuchi : *Polym. Chem.*, **5**, 4764 (2014).

58) R. Cressey, O. Wattananupong, N. Lertprasertsuke, U. Vinitketkumnuen : *BMC Cancer*, **5**, 128 (2005).
59) J. Grunstein, J. J. Masbad, R. Hickey, F. Giordano, R. S. Johnson : *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7282 (2000).
60) Y. Kamon, T. Takeuchi : *ACS Sens.*, **3**, 580 (2018).
61) Z. Bie, Y. Chen, J. Ye, S. Wang, Z. Liu : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 10211 (2015).
62) J. G. Pierce, T. F. Parsons : *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 465 (1981).
63) Y. Tian, H. Zhang : *Proteomics Clin. Appl.*, **4**, 124 (2010).
64) P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek : *Science*, **291**, 2370 (2001).
65) R. G. Heine, N. Laske, D. J. Hill : *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **6**, 145 (2006).
66) T. Saeki, H. Sunayama, Y. Kitayama, T. Takeuchi : *Langmuir*, (In press (DOI:10.1021/acs.langmuir.8b01215)).
67) K. Mori, M. Hirase, T. Morishige, E. Takano, H. Sunayama, Y. Kitayama, S. Inubushi, R. Sasaki, M. Yashiro, T. Takeuchi : *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2019), (in press. (DOI: 10.1002/anie.201811142)).
68) T. Morishige, E. Takano, H. Sunayama, Y. Kitayama, T. Takeuchi : *ChemNanoMat*, (2019), (in press. (DOI: 10.1002/cnma.201800519)).

Oriented Immobilization-based Molecular Imprinting for Constructing Nanocavities Capable of Precise Molecular Recognition

Yukiya KITAYAMA[1] and Toshifumi TAKEUCHI*[1]

* E-mail : takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

[1] Graduate School of Engineering, Kobe University, 1-1, Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe-shi, Hyogo 657-8501

(Received September 21, 2018; Accepted October 25, 2018)

Precise molecular recognition is required for various research and industrial fields, like sensing materials and pharmaceuticals. Oriented template immobilization-based molecular imprinting has been developed for creating artificial molecular recognition materials with high affinity and selectivity towards various target molecules, including small molecules, proteins, and glycoproteins. Molecularly imprinted polymers (MIPs) are artificial polymer-based molecular recognition materials. The molecular imprinting process involves a template polymerization approach, where the molecular complex of functional monomers and the template molecule is copolymerized by using crosslinking agents and a comonomer, followed by removal of the template molecules from the polymer matrix, yielding molecular recognition nanocavities bearing multiple interaction sites. The oriented immobilization of template molecules and precision polymer synthesis with strictly controlled polymer thickness produces precise molecular recognition cavities in MIPs. To date, the proposed oriented template immobilization-based molecular imprinting process has been successfully applied to polymeric thin-layer-based materials, affording highly sensitive and selective sensing materials. This approach can be applied to materials of various shapes, including particle-based materials, which leads to high-affinity chromatography agents and nanoparticle-based pharmaceutical materials. Therefore, the novel strategy based on molecular imprinting described herein can be applied to create various intelligent materials.

***Keywords*:** molecular imprinting; molecular recognition; sensors; oriented immobilization; controlled/living radical polymerization.