

# 解説

## 核酸アプタマーとターゲットの相互作用の熱力学的解析

山岸 賢司<sup>a</sup>, 坂本 泰一<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> 日本大学・工学部

<sup>b</sup> 千葉工業大学・先進工学部

(受取日: 2023年4月11日, 受理日: 2023年4月24日)

## Thermodynamic Analysis of Nucleic Acid Aptamers Binding to Their Targets

Kenji Yamagishi<sup>a</sup>, Taiichi Sakamoto<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> College of Engineering, Nihon University

<sup>b</sup> Faculty of Advanced Engineering, Chiba Institute of Technology

(Received Apr. 11, 2023; Accepted Apr. 24, 2023)

Aptamers are nucleic acid molecules that bind to target molecules with high affinity and specificity, which are obtained using a technique known as Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX). Although aptamers are being researched and developed as promising molecular-targeted therapeutic agents, the mechanism of aptamer binding to the target proteins with their high affinity and specificity is not clear. Therefore, structural and biophysical studies are important to know that, and isothermal titration calorimetry (ITC) to study the thermodynamic basis of aptamer-target protein interactions has become very important. Furthermore, physicochemical insights obtained from molecular simulation are also important. Understanding the mechanism of aptamer binding will contribute to the development of the aptamer therapeutic agents.

Keywords: Thermodynamics, Isothermal titration calorimetry, Fragment molecular orbital calculation, Molecular dynamics simulation, Aptamer

### 1. はじめに

#### 1.1 核酸医薬品

近年, 様々な創薬基盤技術を用いた研究開発によって, 低分子の医薬品だけではなく, 抗体医薬品, 核酸医薬品, 遺伝子治療薬など, 様々な医薬品が実用化されており, このような様々な創薬・治療方法に対して創薬モダリティという言葉が使われている。核酸医薬品は, 化学合成された DNA や RNA および人工核酸からなる医薬品であり, 2023年3月までに16品目が承認されており, 次世代の分子標的薬として注目されている。16品目の核酸医薬品のうち9品目はアンチセンス核酸とよばれ, 5品目は siRNA とよばれている。<sup>1)</sup> これらは, RNA に対して塩基配列の相補性により結合して作用する (Fig.1, Table 1)。アンチセンス核酸の場合は, 病気の原因となっている mRNA に結合すると, 細胞内の RNase H のはたらきによって mRNA が分解される。また, pre-mRNA に結合すると, スプライシング反応が

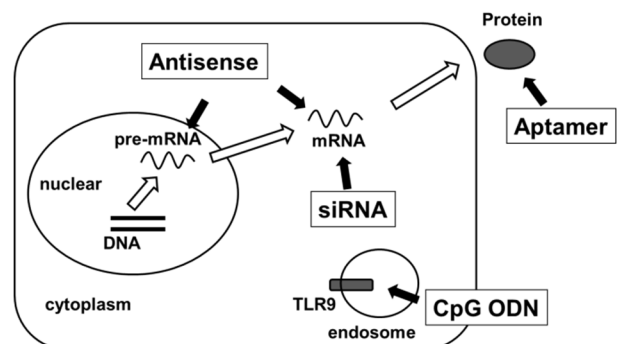
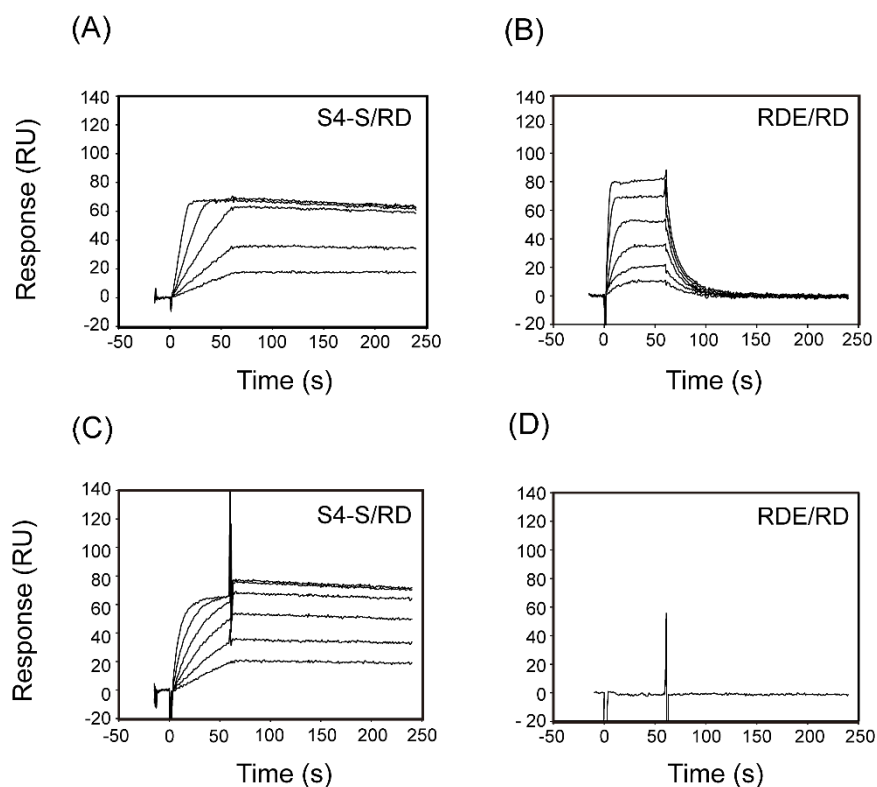


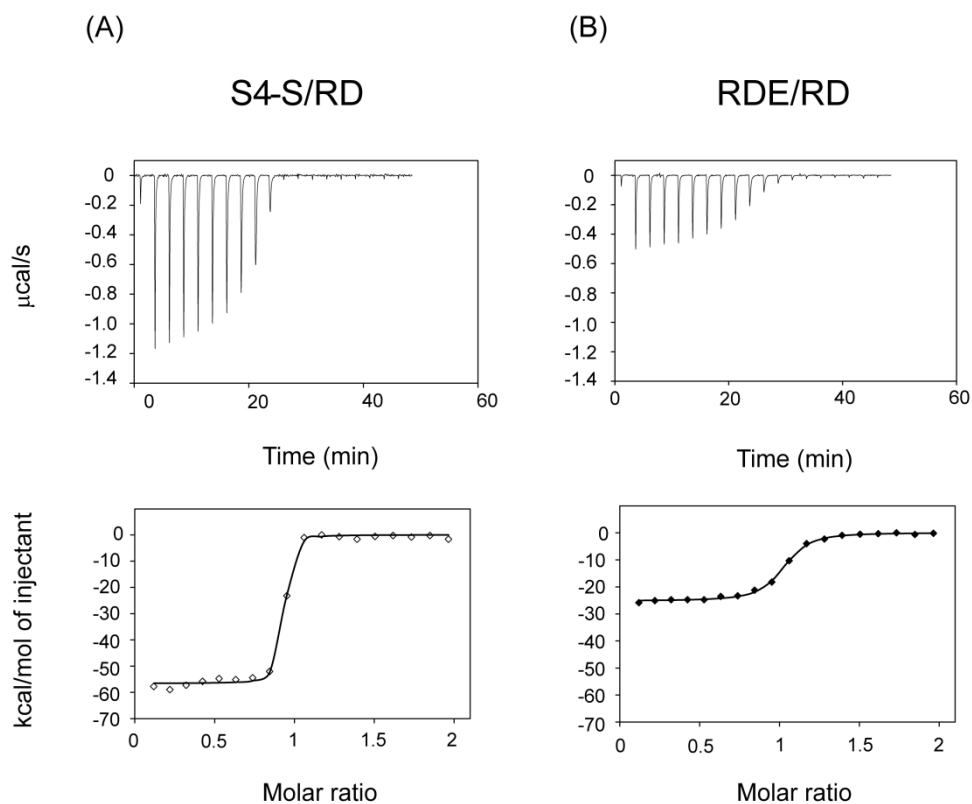
Fig.1 Targets of oligonucleotide therapeutics.

調節されて, 異常タンパク質の発現を抑えたり, 機能性タンパク質の産生を増加したりする。siRNA の場合は, 片方の鎖が細胞内で RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ, 病気の原因となっている mRNA を切断する。





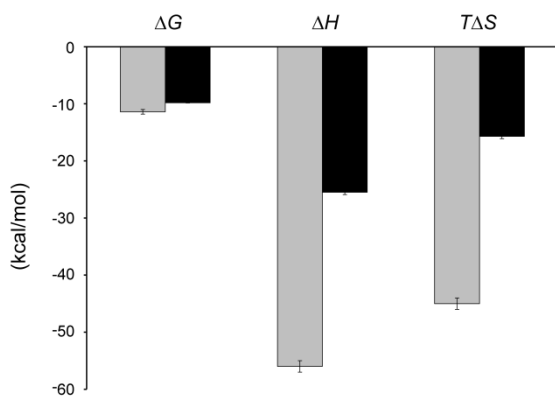
**Fig.3** SPR sensorgrams of RD binding to S4-S or RDE at 298 K. (A) RD binding to S4-S at 300 mM potassium acetate. (B) RD binding to RDE at 300 mM potassium acetate. (C) RD binding to S4-S at 1 M potassium acetate. (D) RD binding to RDE at 1 M potassium acetate. This figure is reprinted with permission from Ref. [9]. Copyright 2016 American Chemical Society.



**Fig.4** ITC data of RD binding to S4-S or RDE at 298 K. Titrations of RD with (A) S4-S or (B) RDE were performed at 300 mM potassium acetate. Top panels show ITC traces and bottom panels show integrated heat values. Data were fitted using the one-set of sites binding model. This figure is reprinted with permission from Ref. [9]. Copyright 2016 American Chemical Society.

結合が弱くなったが ( $K_d=3.5$  nM), 結合力を保持していることがわかった。さらに結合と解離に着目すると, 300 mM 酢酸カリウムの条件に比べて  $k_{on}$  が約 1/100 小さくなったが,  $k_{off}$  はほとんど変わらないことが明らかとなった。

次に, ITC による相互作用解析を行った (Figs.4, 5)。RD に対して S4-S あるいは RDE を滴定したところ, どちらも発熱が観測された。滴定曲線より, RD と S-4S および RD と RDE の結合比はどちらも 1:1 であることがわかった。さらに,  $\Delta H$  については, RDE の結合 ( $-25.5$  kcal mol<sup>-1</sup>) に比べて S4-S の結合 ( $-56$  kcal mol<sup>-1</sup>) の方が大きな変化であることが明らかとなった。C 値 (試料濃度  $\times N/K_d$ ) が 1000 より大きいため, curve fitting の精度が低く, S4-S の  $\Delta S$  は誤差を含んでいるが, S4-S の結合による  $T\Delta S$  は  $-45$  kcal mol<sup>-1</sup> であり, RDE の結合による  $T\Delta S$  は  $-15.7$  kcal mol<sup>-1</sup> であることが明らかとなった。また, 筆者らは RDE との競合法により相互作用解析を行い, 正確な  $T\Delta S$  が  $-42.5$  kcal mol<sup>-1</sup> であることを明らかにしている。<sup>7)</sup> 以上の結果から, RD に対する S4-S および RDE の結合は, ともにエンタルピー駆動であることがわかった (Fig. 5)。さらに, S4-S が RDE より強い結合能を示すのは, 非常に大きなエンタルピー変化によるものであることがわかった。一方で, エントロピー変化も, S4-S の結合では RDE の場合に比べて非常に大きかった。大きなエンタルピー変化が, 相互作用に不利にはたらくエントロピー変化を補償することによって, S4-S と RD は強く結合することが明らかとなった。



**Fig.5** Comparison of thermodynamic parameters for RD binding to S4-S (gray) and RDE (black). This figure is reprinted with permission from Ref. [9]. Copyright 2016 American Chemical Society.

RDE の結合に比べて S4-S の結合の方が大きな  $\Delta H$  であったことから, S4-S が RD に対して非常に強い結合能をもつのは, S4-S が RD に結合する際に RD の立体構造にフィットするように特異的に結合し, 最適な水素結合やファンデルワールス結合などが形成されていることが考えられる。また, RDE の結合に比べて S4-S の結合の方が大きな  $T\Delta S$  であったのは, S4-S と RD の結合による溶媒和エントロピーまたは構造エントロピー, あるいは両方のエントロピーの減少によると考えられるが, 一般に RNA の立体構造はタンパク質に比べて柔らかいことから, RD に結合することによる構造エントロピーの減少が大きな  $T\Delta S$  の原因になっていると考えている。実際に, S4-S の NMR 解析を行うと, 多岐ループを中心に立体構造の揺らぎが大きいことが示唆されている。

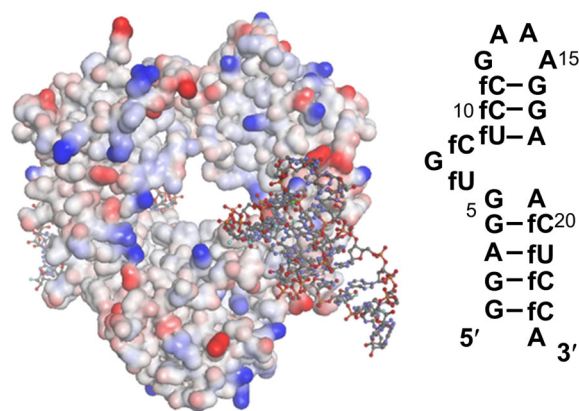
SPR 解析と ITC 解析の結果から, 筆者らは次のような S4-S の結合モデルを考えた。高塩濃度で結合速度定数が小さくなることから, 結合の初期段階では, RD の正電荷と S4-

S の負電荷による静電的な相互作用によって結合が起こる。さらに, エントロピー変化が大きいことから, 柔軟な S4-S は, induced fit によって RD の立体構造に合わせるように結合する。この結合によって多くの水素結合やファンデルワールス結合が形成されるため, エンタルピー変化が大きく, 解離が非常に遅くなると考えられる。現在, この相互作用モデルを明らかにするために, 筆者らは複合体の X 線結晶構造解析を試みている。

## 2.2 免疫グロブリン IgG1 に結合するアプタマーの解析

ヒト抗体 IgG1 の定常部位である Fc ドメイン (hFc1) に結合する RNA アプタマー ( $K_d =$  約 10 nM) が作製されている。<sup>13,14)</sup> 抗体医薬品の生産において, hFc1 に結合する Protein A を固定化した樹脂が精製に使用されているが, このアプタマーは Protein A に代わるものとして期待されている。Protein A は, 他の生物種の抗体に結合することから広い交差性を持つが, このアプタマーはヒトの Fc に対してのみ結合し, 非常に高い特異性を持つため, 他生物種の抗体の混入を防ぐことができる。また, Protein A 樹脂から抗体医薬品を溶出する際には, 酸性にする必要があるため, 抗体が変性してしまうことがある。しかし, アプタマー樹脂の場合, Mg<sup>2+</sup>あるいは Ca<sup>2+</sup>を含む条件で抗体医薬品を結合させた後, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を加えて中性で溶出することができるため, 抗体が変性して失活してしまうことはない。

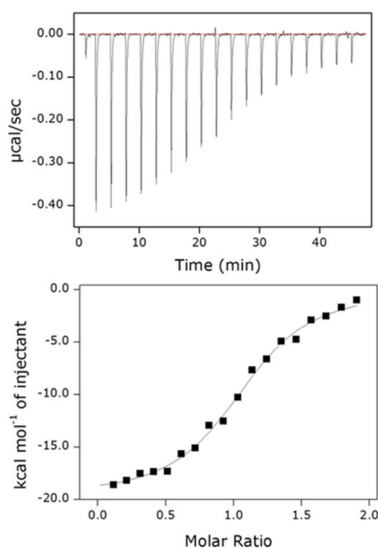
筆者らは, このアプタマー (fC, fU; C と U のリボースの 2'位は F 修飾) と hFc1 の複合体の結晶構造を分解能 2.1 Å で明らかにした (Fig.6)。<sup>15,16)</sup> 結晶構造からは, 二価のカチオンである Ca<sup>2+</sup>がアプタマーのリン酸骨格と相互作用して, hFc1 に結合したアプタマーの構造を安定化していることが明らかとなった。Ca<sup>2+</sup>が EDTA によりキレートされるとアプタマーの結合能が失われる原因が明らかとなった。また, hFc1 の 342 番目のグルタミン残基 (Gln342) の側鎖とアプタマーが相互作用していることがわかった。この Gln342 はヒトの IgG1 に特徴的なアミノ酸であることから, この Gln342 とアプタマーの相互作用が高い特異性の原因であることが示唆された。さらに, 単体の hFc1 の結晶構造と比較すると, 単体からアプタマーとの複合体になっても hFc1 の構造はほとんど変化しないことが明らかとなった。一方で, 単体のアプタマーの NMR 解析からは, 溶液中でアプタマーの立体構造は揺らいでいることが示唆された。



**Fig.6** Crystal structure of the complex of hFc1 and the aptamer and secondary structure of the aptamer. Electric surface of hFc1 is shown (Blue; positive, Red; negative). The aptamer is represented by ball and stick.

従って、hFc1 の固い構造の表面に柔らかいアプタマーがフィットするように induced fit が起きていることが示唆された。また、IgG1 は核酸結合タンパク質ではないが、中性な表面にアプタマーが結合していることが明らかとなった。

IgG1 とアプタマーの相互作用を ITC 解析したところ、発熱が観測された (Fig.7)。滴定曲線からは、二量体の IgG1 に二分子のアプタマーが結合し、エンタルピー駆動の相互作用であることが明らかとなった。前述の RD に結合するアプタマーと同様に、大きなエンタルピー変化が、不利なエントロピー変化を補償することによって結合することが明らかとなった。この場合も柔軟なアプタマーが、induced fit によって IgG1 の立体構造に合わせるように結合していると考えられる。筆者らは、このような作用機序が高親和性アプタマーの特徴であると考えている。



**Fig.7** ITC data of aptamer binding to hFc1 at 298 K. Top panels show ITC traces and bottom panels show integrated heat values. Data were fitted using the one-set of sites binding model.

### 3. 計算化学を用いた相互作用解析

筆者らは、アプタマーが標的分子をどのように認識し結合するのか、その分子メカニズムを計算化学により明らかにすることを試みている。

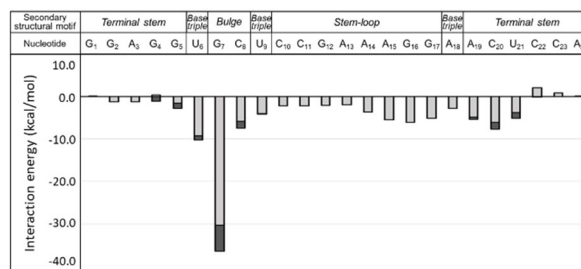
#### 3.1 フラグメント分子軌道計算

フラグメント分子軌道 (FMO) 計算は、分子を小さなフラグメントに分割して計算することで、タンパク質や核酸などの生体分子に対する量子化学計算を可能とした計算手法である。<sup>17)</sup> FMO 計算では、分子全体のエネルギーや電子密度などを計算できるだけなく、フラグメント間の相互作用エネルギー (Inter-Fragment Interaction Energy: IFIE) を計算できることが大きな特徴である。<sup>17)</sup> この IFIE を用いることで、分子の任意の部位間の相互作用エネルギーを計算できる。さらに、この相互作用エネルギーは、静電力とファンデルワールス力の各エネルギー成分に分割して算出することもできる。量子化学計算である FMO 計算は計算精度が高く、生体分子の立体構造の形成に重要な水素結合や CH- $\pi$ 、 $\pi$ - $\pi$  相互作用などの分子間相互作用を正しく評価することができ、分子間相互作用の解析手法として最適である。

筆者らはこれまでに、この FMO 計算を免疫グロブリン

IgG1 の hFc1 領域に結合するアプタマーに対して適用し、アプタマーとその標的分子である hFc1 との間にはたらく分子間相互作用を詳細に解析してきた。<sup>18)</sup> FMO 計算におけるフラグメント分割では、アプタマーをヌクレオチド単位でフラグメントに分割したうえで、さらに「リボース-5-リン酸部位」と「塩基部位」の2つの部位に分割した。また、hFc1 をアミノ酸ごとにフラグメントに分割した。これにより、アプタマーと hFc1 との相互作用を、「リボース-5-リン酸部位-アミノ酸」、および「塩基部位-アミノ酸」という枠組みで求めることができる。

まず、アプタマーと hFc1 との相互作用を、アプタマーのヌクレオチドごとに解析した (Fig.8)。その結果、アプタマーの7番目のグアノシン残基 (G7) は、hFc1 と最も強く相互作用しており、アプタマーの結合に重要な役割を持つヌクレオチドであることを、相互作用エネルギーという定量的な観点から明らかとすることができた。

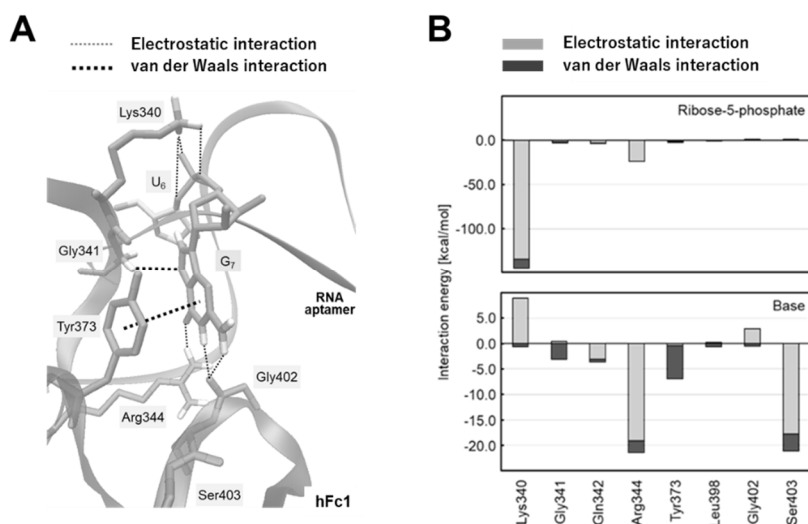


**Fig.8** Interaction energies between each nucleotide of the aptamer and hFc1 using IFIE analysis based on FMO calculation. The gray bar indicates electrostatic interaction energy and the dark gray bar indicates the van der Waals interaction energy.

次に G7 の形成する相互作用を、部位ごとに詳細に解析した (Fig.9)。その結果、G7 のリン酸骨格と Lys340 との相互作用は  $-133.4 \text{ kcal mol}^{-1}$  であり、このうち静電力に相当する相互作用エネルギーは、 $-128.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  であった。G7 のリン酸部位と Lys340 の間にはたらく静電力による引力は強く、アプタマーの結合の駆動力となると示唆される。次に、ベースフリップ構造をとる G7 塩基部位と hFc1 のアミノ酸残基との相互作用を解析すると G7 の塩基部位は、Arg344、および Ser403 とそれぞれ  $-18.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ 、および  $-15.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  の相互作用エネルギーを示した。この相互作用は、G7 塩基部位と Arg344 の側鎖、および Gly402-Ser403 間の主鎖のカルボニル酸素との水素結合の形成に起因するものと考えられる。また G7 塩基部位は、Tyr373 の側鎖と  $\pi$ - $\pi$  スタッキングを形成しており、ファンデルワールス力に基づく相互作用エネルギーは  $-5.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  であった。さらに、G7 塩基部位と Gly341 との相互作用エネルギーは  $-1.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  であり、これは G7 塩基部位と Gly341 の水素原子との CH- $\pi$  相互作用に基づくファンデルワールス力であると考えられる。

以上の解析より hFc1 に結合するアプタマーは、G7 ヌクレオチドのリン酸部位と Lys340 との強い静電力によって、G7 塩基のベースフリップ構造が形成され、アプタマーは hFc1 の分子表面との間に高度な形状相補性を生じさせることができる。それによって G7 塩基部位は、hFc1 のアミノ酸と様々な分子間相互作用 (Arg344 の側鎖、および Gly402-Ser403 間の主鎖のカルボニル酸素との水素結合、Tyr373 の側鎖との  $\pi$ - $\pi$  相互作用、および Gly341 との CH- $\pi$  相互作用) を形成することができ、その結果アプタマーは高い親和性と特異性で hFc1 と結合することができると





**Fig.9** Interactions between base-flipped G7 nucleotide and each amino acid residue of hFc1. (A) Important interactions of the G7 nucleotide in aptamer. Thin and heavy dotted lines indicate electrostatic interactions and dispersion interactions, respectively. (B) The interaction energies between the ribose-5-phosphate and base group of the G7 nucleotide and amino acid residues of hFc1 within 3 Å from the aptamer, respectively. The gray bar indicates electrostatic interaction energy and the black bar indicates the van der Waals interaction energy. This figure is reprinted from Ref. [18]. Copyright 2020, with permission from Elsevier.

示唆される。このように FMO 計算を用いることで、結晶構造に基づく距離情報だけでは解析することが難しい相互作用を、エネルギーという定量的な値として解析することができる。FMO 計算により得られる hFc1 との特異的な相互作用からは、アプタマーの結合に伴うエンタルピー変化に関する情報を得ることができる。

### 3.2 分子動力学計算

筆者らはアプタマーと hFc1 との相互作用の解析に、FMO 計算の他に分子動力学 (MD) 計算を用いた解析にも取り組んでいる。<sup>19)</sup> MD 計算は、物質系を構成するそれぞれの原子についてニュートン運動方程式を数値的に解くことにより、位置、速度、エネルギーなどの原子が動く軌跡 (トラジェクトリー) を追跡する方法である。MD 計算により得られたトラジェクトリーからは、構造の安定性や揺らぎについての情報を得ることができる。<sup>20)</sup>

そこで筆者らは、標的分子である hFc1 と結合していない解離状態のアプタマー (free form) と hFc1 と結合した状態のアプタマー (bound form) の構造の揺らぎや構造の安定性について解析するため、アプタマー単体の構造に対する MD 計算と、アプタマーが hFc1 に結合した複合体の構造に対する MD 計算を行った。

**Fig.10** は、free form と bound form のアプタマーに対する MD 計算の各トラジェクトリーに対して、その代表構造を解析し図示したものである。その結果、アプタマーのステム領域では、free form においては形成されていない fc23

と A24 のスタッキングが、bound form では形成されている (**Fig.10(b)**)。アプタマーのベーストリプル領域は、bound form ではその構造が維持されているものの、free form では形成されていなかった (**Fig.10(c)**)。バルジ領域では、G7 と fc8 のスタッキングが、free form では、主鎖に対して垂直に位置しているが、bound form では、主鎖に対して平行に位置していた (**Fig.10(d)**)。

このように MD 計算を用いることで、標的分子との結合に伴うアプタマーの動的な構造の変化を、分子レベルで解析することができる。MD 計算により解析できるアプタマーの構造ダイナミクスからは、アプタマーの結合に伴うエンタルピー変化に関する情報を得ることができる。

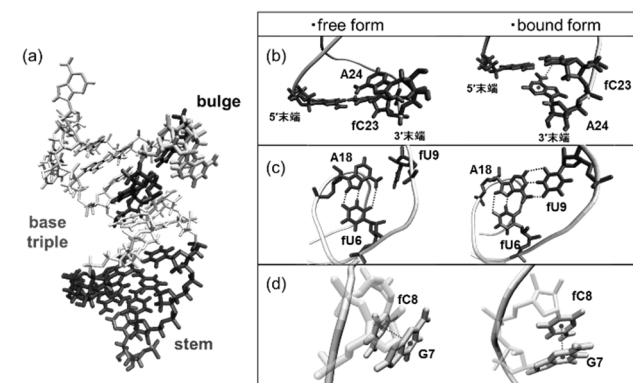
### 4. おわりに

本論文では、核酸アプタマーとそのターゲット分子の相互作用の熱力学的解析について、筆者らが取り組んでいる解析について記載した。

本論文で解析の対象とした核酸アプタマーは、核酸医薬として高いポテンシャルを持つものの、医薬品等に应用するためには、アプタマーの分解を抑制したり、高機能化したりするために化学修飾が必要となっている。しかし、この化学修飾は、1 残基ずつ修飾しては結合活性を調べるといった試行錯誤で行われており、多大なコストと時間が費やされている。そこで筆者らは、アプタマーに対する化学修飾の影響について SPR 解析や ITC 解析、NMR 解析など多面的に解析している。特に、アプタマーと標的分子との相互作用の解析に、SPR や ITC などの熱力学的な解析手法に加え、FMO 計算や MD 計算などの計算化学による解析手法を取り入れることで、アプタマーの立体構造やアプタマーとターゲット分子間の相互作用機序を詳細に解析している。そして、それらの情報をもとにアプタマーを設計する基盤技術の確立を試みている。

近年、アプタマーをはじめとする核酸医薬品が注目されており、その効果を高めたり、安全性を高めたりするためには、核酸医薬品の物性を明らかにすることは非常に重要である。一方で、核酸の NMR 解析、熱力学的解析、計算化学による解析の例は少ないのが現状である。

20 種類のアミノ酸からなるタンパク質に比べて、4 種類のヌクレオチドからなる核酸の構造や物性の多様性は少ないが、近年の核酸医薬品には様々な化学修飾ヌクレオチドが導入されており、それらの物性を明らかにすることの重要性は高まってきている。<sup>21-23)</sup>



**Fig.10** Snapshot structures during MD calculation of aptamer. (a) overall structure of aptamer, Close up view of (b) stem region, (c) base triple region, (d) bulge region.

謝 辞

本原稿の内容は、筆者らがアプタマーの熱力学的解析を中心に計算化学を含めた物理化学的な解析で得た知見をまとめたものである。長きにわたりアプタマーについてご指導いただいた中村義一名誉教授（東京大学）、神津知子博士（元埼玉県立がんセンター）ほか、多くの共同研究者に感謝申し上げます。また、アプタマーの熱力学的解析に粘り強く取り組んでくれた天野亮博士（東京大学）に感謝します。最後に、本原稿を執筆する機会をくださった廣瀬雅子氏（スペクトリス株式会社）に感謝いたします。

本研究の一部は、科研費（21K12129）、JST トライアウト（JPMJTM20KM）の研究助成により実施されました。

文 献

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部ホームページ <https://www.nihs.go.jp/mtgt/section2.html>
- 2) A. D. Ellington and J. Szostak, *Nature* **346**, 818–822 (1990).
- 3) C. Tuerk and L. Gold, *Science* **249**, 505–510 (1990).
- 4) E. W. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham Jr., D. R. Guyer, and A. P. Adamis: *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 123–132 (2006).
- 5) A. D. Gelinias, D. R. Davies, and N. Janjic, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **36**, 122–132 (2016).
- 6) Y. Nakamura, *Biochimie* **145**, 22–33 (2018).
- 7) R. Amano, T. Furukawa, and T. Sakamoto, *Methods in Mol. Biol.* **1964**, 119–128 (2019).
- 8) T. Sakamoto, E. Ennifar, and Y. Nakamura, *Biochimie* **145**, 91–97 (2018).
- 9) R. Amano, K. Takada, Y. Tanaka, Y. Nakamura, G. Kawai, T. Kozu, and T. Sakamoto, *Biochemistry* **55**, 6221–6229 (2016).
- 10) K. Takada, R. Amano, Y. Nomura, Y. Tanaka, S. Sugiyama, T. Nagata, M. Katahira, Y. Nakamura, T. Kozu, and T. Sakamoto, *FEBS Open Bio* **8**, 264–270 (2018).
- 11) J. Fukunaga, Y. Nomura, Y. Tanaka, R. Amano, T. Tanaka, Y. Nakamura, G. Kawai, T. Sakamoto, and T. Kozu, *RNA*, **19**, 927–936 (2013).
- 12) Y. Nomura, Y. Tanaka, J. Fukunaga, K. Fujiwara, M. Chiba, I. Iibuchi, T. Tanaka, Y. Nakamura, G. Kawai, T. Kozu, and T. Sakamoto, *J. Biochem.* **154**, 513–519 (2013).
- 13) S. Miyakawa, Y. Nomura, T. Sakamoto, Y. Yamaguchi, K. Kato, S. Yamazaki, and Y. Nakamura, *RNA* **14**, 1154 (2008).
- 14) E. Inomata, E. Tashiro, S. Miyakawa, Y. Nakamura, and K. Akita, *Biochimie* **145**, 113 (2018).
- 15) S. Sugiyama, Y. Nomura, T. Sakamoto, T. Kitatani, A. Kobayashi, S. Miyakawa, Y. Takahashi, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, Y. Nakamura, and H. Matsumura, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**, 942 (2008).
- 16) Y. Nomura, S. Sugiyama, T. Sakamoto, S. Miyakawa, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, Y. Nakamura, and H. Matsumura, *Nucleic Acids Res.* **38**, 7822 (2010).
- 17) K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano, and M. Uebayasi, *Chem. Phys. Lett.* **313**, 701–706 (1999).
- 18) H. Yoshida, K. Sato, T. Ishikawa, T. Sakamoto, and K. Yamagishi, *Chem. Phys. Lett.* **738**, 136854 (2020).
- 19) 石井清一郎, 関口真裕, 吉田尚恵, 増川恵介, 石川岳志, 坂本泰一, 山岸賢司, *J. Comput. Chem. Jpn.* **18(5)**, 208–210 (2019).
- 20) *Computer Simulation of Liquids*, Oxford university press: Clarendon Press (1989).
- 21) H. Minagawa, K. Onodera, H. Fujita, T. Sakamoto, J. Akitomi, N. Kaneko, I. Shiratori, M. Kuwahara, K. Horii, and I. Waga, *Sci. Reports* **7**, 42716 (2017).

- 22) S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, H. Yoshikawa, K. Miyashita, and T. Imanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4886–4896 (2008).
- 23) M. Kimoto, R. Yamashige, K. Matsunaga, S. Yokoyama, and I. Hirao, *Nature Biotech.* **31**, 453–457 (2013).



山岸 賢司  
Kenji Yamagishi  
E-mail: yamagishi.kenji@nihon-u.ac.jp



\*責任著者  
坂本 泰一  
Taiichi Sakamoto  
E-mail: taiichi.sakamoto@p.chibakoudai.jp