

Accounts of Materials & Surface Research

Chemical Method to Selectively Transform A Predetermined Site in Genomic DNA

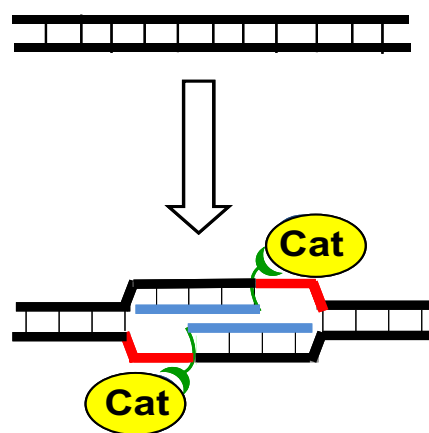
Makoto Komiyama

The University of Tokyo

7-3-1 Hongo, Tokyo 113-8856, Japan

makotokomiyama@yahoo.com

One of the most important goals of the current nucleic acid science is to develop a methodology to transform a predetermined site in genomic DNA (and RNA therefrom) to another form. For example, one target nucleotide in the genome should be methylated, oxidized, reduced, and modified otherwise. Furthermore, various functional moieties (e.g., metal complexes, chromophores, and sophisticated nanostructures) are introduced to target site in genomes. In the method developed by our group, single-stranded portion as a hot spot for selective transformation is formed at target site, and appropriate catalyst is placed there. In order to construct the desired structure in double-stranded DNA substrate, double-duplex invasion of pseudo-complementary PNA (pcPNA) is employed. Importantly, the binding sites of two pcPNA strands (blue lines) are laterally shifted each other by several bases to form a single-stranded portion(s). The catalyst is covalently bound to the pcPNA. As a proof-of-concept of this strategy, artificial DNA cutter to cut genomic DNA at a predetermined site was fabricated. By combining these pcPNAs with Ce(IV)/EDTA complex, site-selective scission of human genome was successfully accomplished. This system recognizes in total 20-bp sequence in double-stranded DNA (one 10-bp sequence involving two pcPNA invasion + two 5-bp sequences involving one pcPNA invasion). Accordingly, even in human genome (3×10^9 bp), only one site can be selectively cut ($4^{20} \gg 3 \times 10^9$).



Keyword: DNA, Site-selective transformation, PNA, Hydrolytic scission

Makoto Komiyama received his Ph.D. from The University of Tokyo in 1975. After spending four years at Northwestern University (Illinois, USA) as a postdoctoral fellow, he became an assistant professor at The University of Tokyo, and then an associate professor at University of Tsukuba. In 1991, he was promoted to a professor of The University of Tokyo. In 2012, he retired from this university and became a professor emeritus. Then, he spent four years at University of Tsukuba, and two years at the National Institute for Materials Science, Tsukuba. In 2016-2019, he was a visiting professor of Ocean University of China.



巨大 DNA の所定位置を選択的に化学変換する人工ツールの開発

小宮山 眞

東京大学・名誉教授

1. はじめに

バイオテクノロジーの発展は驚異的であり、まさに日進月歩である。しかし、将来的にさらに大きく発展するためには、高等生物の巨大ゲノムを正確に操作して、望み通りに改変することが必須である。単に、特定の核酸塩基を他の塩基に変えるだけではない。特定の位置をメチル化したり、酸化還元したり、さらには、種々の非天然の官能基や金属錯体、発色団、機能性ナノ構造体などを目的の場所に導入することを目指している。こうして、天然のゲノムの中の望みの位置に望みの官能基（ならびに高機能性構造体）を自在に導入して改造ゲノムを構築する。すなわち、ゲノムという遺伝情報の宝庫でしかも構造制御が可能な巨大分子に、さらに必要な化学修飾を加えて我々の望みの機能素子に変換するわけである。これらの改造ゲノムがどのような生物学的機能を示すかはもちろん興味深い。しかし同時に、材料科学という観点から見れば、改造ゲノムは幅広く応用可能な超高機能高分子素材である。改造ゲノムを合目的的に二次元、三次元に規則的に配列し、その間のコミュニケーションを正しく制御すれば、情報処理分野はもちろん、その他のさまざまな分野において大活躍できるものと期待される。¹⁻⁴

最近になって、CRISPR-Cas9 システムという生化学ツールが開発され、ゲノム中の任意の遺伝子を改変するために広く活用されている。⁵この優れたツールを使えば、ゲノムの中の特定の遺伝子を別の遺伝子に変えて、生物機能を改変することができる。しかし、化学者の立場からすると、単にゲノムの生物学的機能を改変するだけではなく、ゲノムの中

の特定の場所を非天然の化学構造に変えて、その生物学的な影響を評価してみたい。さらには、これらの改造ゲノムを新たな材料素材として利用し、現状をはるかに超える超高機能材料を構築したいわけである。

しかしながら、高等生物のゲノムは極めて巨大であり（ヒトのゲノムは約30億の塩基対で構成される）、これを正確に操作して任意の位置を化学変換する技術は未だ確立されていない。もちろん、制限酵素とリガーゼを使った古典的な遺伝子操作は使えない。それは、天然の制限酵素の多くは4-8塩基対しか認識せず、ゲノムを所定の1か所で切断するには特異性が低すぎるからである。ゲノムの中の特定の場所を望み通りに改変するには、何らかの手法で、より長い塩基配列を認識することがまず必要である。確率論からいえば、A,G,C,Tの4種の核酸塩基がランダムに分布していると仮定すれば、ヒトゲノムの中の1か所を規定するには、少なくとも16個の塩基対の配列を認識することが必須である（ $\because 4^{16} > 30$ 億）。その上で、規定された箇所を正確に化学変換するための工夫が、さらに必要である。

我々の研究グループは、この難問の解決を一大目標として、約30年にわたり鋭意研究を重ねてきた。その結果、人工核酸であるペプチド核酸（PNA: Peptide Nucleic Acid）を活用することにより、ある程度まで満足の行く解答を得ることに成功した。本稿では、その概略を紹介したいと思う。

2. ゲノムの所定位置を改変する人工酵素の基本設計

巨大なゲノムの中の所定の1箇所を正確に

選び出し、ここだけを選択的に化学変換するのは難問である。我々は、これを実現する人工酵素を、Figure 1 に示すような2つの方法論に基づいて開発した。戦略の一つは、基質 DNA 中の改変位置の近傍に、目的とする化学変換を促進する触媒分子を正確に固定して、その場所のみで反応させるものである(a)。すなわち、触媒の近接効果による反応の高活性化である。ここでは、DNA の所定位置に結合する分子(青線)に触媒を共有結合することにより、必要な分子構造を構築している。もう一つの戦略は、適切な反応補助分子(赤)を加えて基質 DNA の構造変化を誘導し、基質 DNA 中で反応させたい位置だけを選択的に活性化するものである(b)。すなわち、反応の位置選択性は、反応部位と他の部位との反応性の差異に起因する。この場合、触媒を反応部位の近傍に結合する必要は必ずしもない。第 5 項で紹介する DNA 切断ツールでは、これらの二つの戦略を協同的に作用させている。

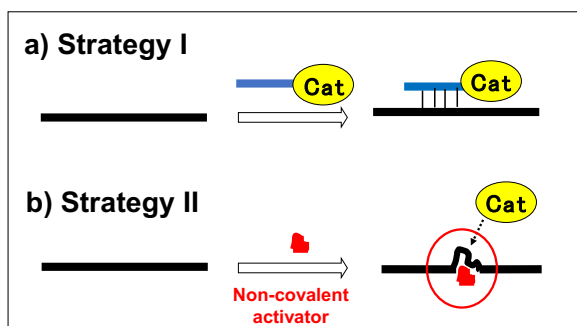


Figure 1. Two strategies for site-selective transformation of DNA. a) **Strategy I:** the catalyst is covalently fixed at target site. b) **Strategy II:** target site is selectively activated by non-covalent interactions with co-catalyst (red), and transformed by the catalyst for the reaction. Throughout this review, each strand of DNA and PNA is shown by bold lines, and thin lines between them are Watson-Crick base-pairs.

3. ゲノムの所定位置に選択的に結合する小分子の開発

この人工酵素を設計する際にまず必要となるのは、ゲノムの中の所定位置を正確に認識してここに結合する分子である。1 項で述べた通り、このためには、少なくとも 16 塩基の配列を正確に認識してここに結合する必要がある。

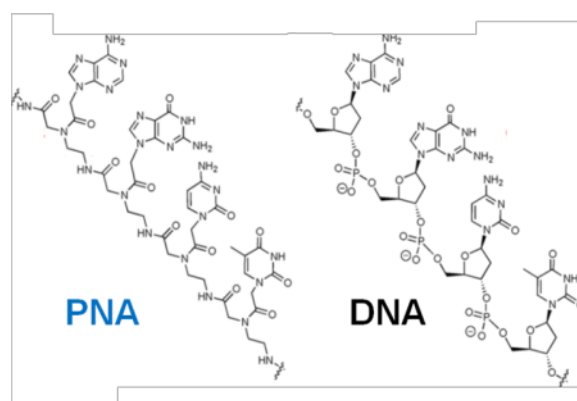


Figure 2. Molecular structure of PNA as a synthetic DNA analog used for the present study (left). For the purpose of comparison, the structure of DNA is also presented in the right.

3.1 ペプチド核酸 (PNA)

本稿で紹介する戦略で主役を果たす PNA は、通常の DNA においてヌクレオチド同志を結合するリン酸ジエステル結合の代わりに、アミド結合が使用された人工核酸である (Figure 2)。⁶ N-(2-アミノエチル)グリシンが縮重合したポリアミド骨格の側鎖に、4 種の核酸塩基 (A, G, C, T) が結合している。最大の特徴は、主鎖が電氣的に中性であることである。このように PNA は DNA とは大きく異なる構造をしているにも関わらず、相補的な配列を持つ DNA (ならびに RNA) と Watson-Crick 則にしたがって二重鎖を形成する。し

かも、PNA と DNA との二重鎖は、対応する DNA/DNA 二重鎖よりもはるかに安定である。それは、多数の負電荷を持つ DNA 同士が二重鎖を形成する際には鎖同士の間には強力な静電反発が生じるのに対し、主鎖が電的に中性な PNA は DNA と二重鎖を形成しても静電反発をもたらさないからである。

3.2 インベージョン複合体形成による DNA 二重鎖の中の所定位置の認識

言うまでもなく、高等生物のゲノムは DNA の二重鎖構造であるので、一本鎖状態の DNA や PNA による単なる相補鎖形成で所定場所を認識することはできない。ここで、相補的 DNA と非常に安定な二重鎖を形成するという PNA の特徴が威力を発揮する。すなわち、適切な条件下では、2 本の PNA 鎖が DNA 二重鎖の中に潜り込んで、インベージョン複合体を形成する (Figure 3)。ちょうど、ヘビがカエルを飲み込んだような形状をしており、二重らせんとは全く異なる構造になる。当然のこととして、この部分の反応性も大きく変化する。

インベージョン複合体に使用する一対の PNA のうちの 1 本は 2 本鎖 DNA の中の一方の鎖と相補的であり、別の 1 本の PNA はもう一方の DNA 鎖に相補的である。したがって、インベージョンが起こる位置は、我々の設計通りに Watson-Crick 則で完全に一義的に決定されるわけである。また、インベージョン複合体の形成は、自由エネルギー的に favorable なプロセスである。すなわち、この過程では、1 本の DNA/DNA 二重鎖が (部分的に) 解離し、その代わりに、2 本の PNA/DNA 二重鎖が形成される。上述の通り、PNA/DNA 二重鎖の方が DNA/DNA 二重鎖よりも安定であるので、DNA 二重鎖の構造変化などの要因を考慮しても、プロセス全体の自由エネルギー変化は負となりインベージョン複合体の形成 (double-duplex invasion) が

自発的に進行するというわけである。したがって、PNA の代わりに、一対の DNA (オリゴヌクレオチド) を使用したのではインベージョンは決して起こらない。どうしても、主鎖が電的に中性で基質 DNA と結合しても静電反発を引き起こさない PNA を使う必要がある。

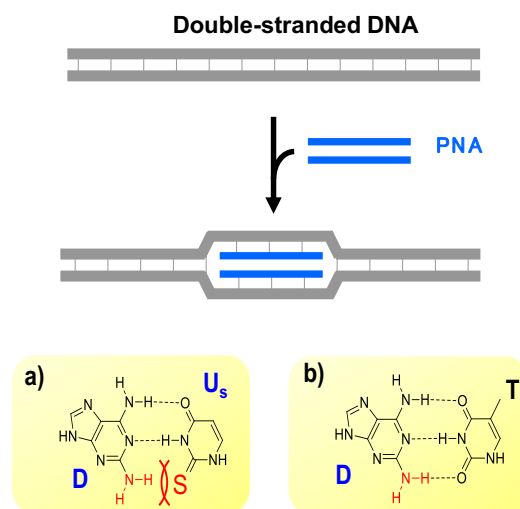


Figure 3. Double-duplex invasion of a pair of PNA strands to double-stranded DNA. In the bottom, molecular structures of pseudo-complementary bases D and U_s are shown. Note that D- U_s pair is unstable due to steric repulsion (a), whereas D-T pair is sufficiently stable (b).

ここで、インベージョン複合体を形成する一対の PNA は、互いに相補的であることに注目いただきたい。そのために、基本的には、反応系内では PNA/PNA 二重鎖の形成が併発し、そのためにインベージョン複合体形成はそれだけ阻害されてしまう。そこで、PNA 同士の相互作用を抑制するために、pseudo-complementary PNA (pcPNA) が開発された。^{7,8} この修飾 PNA では、通常の核酸塩基 A、T の代わりに、2,6-diaminopurine (D), 2-thiouracil (U_s) が使用される。ここで、D と T

は Figure 3b のように安定な塩基対を形成するが、D-U_s 対はアミノ基と硫黄原子との反発のために極めて不安定となる。そのために、pcPNA は相補的な DNA とは安定な二重鎖 (D-T 対) を形成するが、自分と相補的な pcPNA とは容易に二重鎖を形成しない (D と U_s とが対峙する)。こうして、2 本の pcPNA を使用すると、二本鎖 DNA の所定の位置で効率的にインベージョン複合体を形成することができる。したがって、我々の人工酵素の開発でも (いくつかの例外を除いて) pcPNA を使用している。

なお、ゲノムに選択的に結合するタンパク質としては、Zinc finger protein⁹ や Transcription activator-like effector protein¹⁰ などが知られている。しかし、これらの DNA 結合タンパク質に比べても、PNA は分子サイズがはるかに小さく、しかも、結合位置が Watson-Crick 則だけで決まるという長所を持つ。また、pyrrole-imidazole 系の合成ポリアミドが DNA のマイナーグループに配列特異的に結合することが報告されている。¹¹ 分子設計は極めて精緻であり、この分子がマイナーグループに結合しても DNA の構造はほとんど変化しない。この特性は、二本鎖 DNA の分子認識には非常に優れた特性であるが、逆に、DNA に結合してもその構造をあまり変化しないので、本稿で対象としている「位置選択的な化学変換ツールの開発」にはあまり適さない。

4. PNA を活用したゲノム内の所定位置の高活性化

3 項で紹介した一対の PNA のインベージョンを活用すると、2 本鎖 DNA の中の所定の位置を選択的に化学変換する人工ツールが構築できる。その基本原理を Figure 4 に示す。¹² まず、目的とする反応サイトの近傍に結合する一対の pcPNA (青線) を設計合成し、ここに目的反応を促進する触媒を結合する。

これらの pcPNA を 2 本鎖 DNA にインベージョンさせると、2 本鎖 DNA の中で反応させたい位置の近傍に触媒が固定される (Figure 4, 中央)。こうして、基質 DNA 中の所定の位置で、目的の化学変換を位置選択的に進行させることができるというわけである (Figure 1 における Strategy I)。

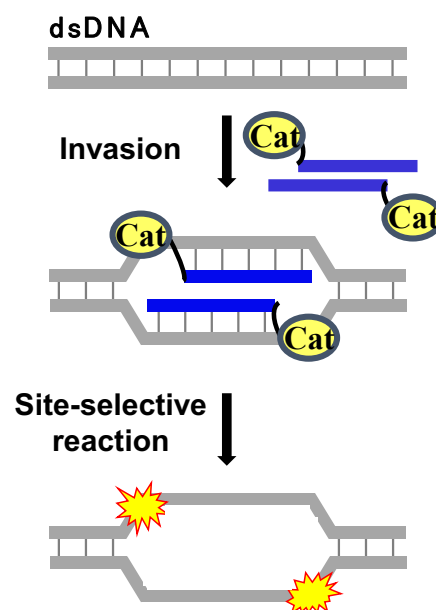


Figure 4. Strategy for site-selective transformation of double-stranded DNA. A pair of PNA (blue lines) bearing an appropriate catalyst invade double-stranded DNA to form double-duplex invasion complex. The positions of these two PNAs are laterally shifted each other, so that a predetermined site in each strand is kept single-stranded. These portions are differentiated from the other parts, and preferentially transformed by the catalysts which are placed nearby through the invasion complex formation.

さらに、この近接効果に加えて、反応性の差異により所定位置を一層顕著に差別化する

(Strategy II)。すなわち、2本の pcPNA が DNA の 2 本の鎖の各々に結合する位置を、互いに数塩基分だけずらしておく (pcPNA の設計により容易に実現できる)。すると、それぞれの pcPNA の片側の DNA が 1 本鎖構造になり、触媒は (2 本の DNA 鎖の各々に形成された) 1 本鎖部分の近傍に固定される。したがって、1 本鎖 DNA を選択的に化学変換するように触媒を選択すれば、反応は目的位置のみでさらに高い選択性で進行することになる。こうして、“近接効果”と“反応性の差”の 2 つの因子で目的場所を差別化することにより、目的とする「ゲノムの特異的位置での選択的な化学変換」が高い選択性で実現される。

5. 位置選択的なゲノムの化学変換ツールの設計法の妥当性の実証

上記の戦略の proof-of-concept として、ヒトのゲノムを所定の位置で選択的に切断する人工酵素を構築した。この位置選択的反応の生成物は DNA の断片であるので、ゲル電気泳動で正確に定量分析できる。この人工酵素は、(i) 2本の pcPNA と (ii) Ce(IV)/EDTA 錯体 とから構成される (Figure 5)。Ce(IV)/EDTA 錯体は、1 本鎖 DNA を特異的に加水分解する特徴を有する (2 本鎖 DNA は加水分解しない)¹³⁻¹⁵ また、この錯体と強く結合するリン酸配位子を pcPNA の端に結合する。4 項で述べたように、これら的一对の pcPNA (青線) は、2 本鎖 DNA のそれぞれの鎖に対して、互いに数塩基分だけずれた位置で結合するように設計してある。そこで、2 本鎖 DNA のインバージョン複合体では、pcPNA の両側に 1 本鎖構造部分 (赤線) が形成される。これが、切断のホットスポットであり、1 本鎖 DNA を特異的に切断する触媒能を持つ Ce(IV)/EDTA 錯体により選択的に加水分解される (Figure 1b に示した Strategy II の活用)。さらに、Ce(IV)/EDTA 錯体は、pcPNA に結合されたリン酸配位子との相互作用により、1 本鎖部分の近傍に濃縮される。そのために、切

断の位置選択性は一層高まる (Strategy I の活用)。PNA は合成高分子であり、その塩基配列と長さは自由に設計できるので、ゲノムのように巨大な 2 本鎖 DNA でも所定の位置で選択的に切断できる。例えば、15 個の核酸塩基で構成された pcPNA を 5 塩基分ずらして使用すると、計 20 個の塩基対が認識される。ゲノムの中で A,G,C,T がランダムに分布していると仮定すると、この配列は確率的には 4^{20} 塩基に 1 回出現する。ここで、 $4^{20} \gg 30$ 億であるので、この人工ツールは、ヒトゲノムの中の 1 箇所を選択的に切断する特異性を有する。¹⁶

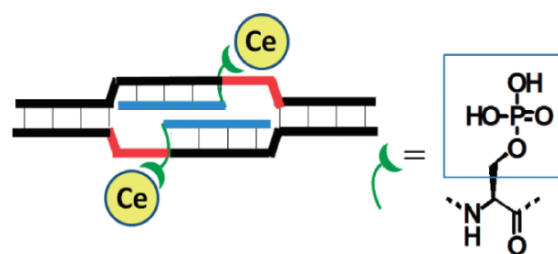


Figure 5. Site-selective hydrolysis of double-stranded DNA by the combination of a pair of pcPNA and Ce(IV)/EDTA. The red portions are made single-stranded by the invasion of two pcPNAs, and selectively hydrolyzed by Ce(IV)/EDTA.

実際に、この分子設計法で人工 DNA カッターを構築し、ヒトゲノムの中のねらった 1 か所を選択的に切断することに成功した。例えば、Figure 6 では、ヒトの細胞から全ゲノム (30 億個の核酸塩基対から構成される巨大 DNA) を抽出し、その中の X 染色体中に存在するガン関連遺伝子の 1 箇所を切断した。抽出した全ゲノムを人工 DNA カッターで処理し、生成物を詳細に解析した。その結果、この人工ツールによる切断は、所定位置でのみ正確に起きていることを確認した。重要なことには、別の染色体に存在する類似配列 (1, 2 塩基対だけがターゲットと

は異なる配列)は、まったく切断されない。すなわち、この人工ツールは、巨大ゲノムの中の多数の類似配列には見向きもせず、ターゲット配列のみを正確に見分けて選択的に切断することが明らかとなった。もちろん、切断サイトの選択は自由であり、所望の位置で切断できる。このように、巨大なヒトゲノムが設計通りに所定位置で正確に切断されたことにより、本稿で示した『巨大ゲノムを位置選択的に化学変換する人工酵素の設計法』(Figure 4)の妥当性が実証された。また、本手法がさまざまな種類の化学変換に適用可能であることも同時に強く示唆された。

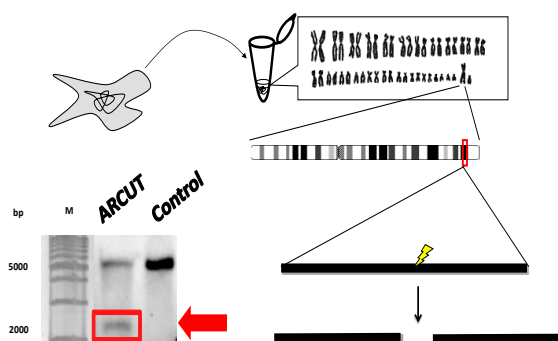


Figure 6. Site-selective hydrolysis of human genome by artificial DNA cutter composed of two strands of pcPNA and Ce(IV)/DNA. The whole genome was extracted from human cells, and treated with the artificial DNA cutter. After the scission, the whole product was digested with a restriction enzyme, and the fragments obtained by the dual scission were analyzed by a blotting study. The site-selective scission of the human genome by the artificial cutter was confirmed by the detection of the band of expected size (see the band highlighted by red square in the gel in the left of the bottom).

この人工酵素によるゲノム切断は、天然

酵素による切断と同様に、リン酸ジエステルの加水分解で進行する。そのために、切断断片はリガーゼで容易に再結合して組換え DNA を調製できる。¹⁷ 切断できるサイトが厳しく限定される天然制限酵素と違って、切断サイトは自由に設計できるので、通常は実施困難な遺伝子組換えでも簡便に実施できる。もちろん、ヒトゲノムから所定の DNA 断片を取り出してくることもできる。¹⁸⁻²³ さらに、この人工酵素をヒト細胞内に導入し、相同組換えを活性化することもできる。²⁴⁻²⁶ 例えば、ヒトのゲノム中に青色蛍光タンパク (BFP) の遺伝子を組み込んでおき、その発光中心形成サイトを切断する。これと同時に、緑色蛍光タンパク (GFP) の発光中心付近をコードした DNA 断片を細胞内に加える。すると、細胞中で、BFP 遺伝子の切断箇所が GFP 遺伝子を鋳型として修復され (相同組換え)、その結果、生成タンパク質の発光中心が GFP のアミノ酸配列に改変されて緑色蛍光を発光する。このように、Figure 4 に示した基本原理に基づいて開発した DNA 切断人工酵素は、現状の分子生物学とのマッチングも極めて良好であり、様々な応用展開が可能である。²⁷⁻²⁹

6. 結語

本稿では、我々のグループが開発した『位置選択的にゲノムを化学変換する人工ツールの設計法』を紹介した。さらに、その妥当性を実証するために、この基本原理に基づいて、ヒトゲノムを所定の位置で選択的に切断する人工ツールを開発した。これまでは、我々は、ゲノムの選択的切断を主たる研究対象に選択してきた。それは、単に、反応の追跡が容易で、当時の分析機器でも結果の解析が可能であったためである。これに対して、その他の反応 (例えばメチル化、酸化還元)

を対象とした場合には、反応が実際にどこで起きたのかを正しく評価するのが極めて困難であった。

しかし、今日までに、質量分析器やシーケンサーをはじめとする DNA 分析技術が飛躍的に進歩した。その結果、巨大なゲノム DNA 中の微細な構造変化も、正確かつ高感度に分析できるようになっている。こうして、大きな課題が克服されたので、本稿で紹介した戦略に基づいて、さまざまな種類の選択的化学変換を実施・検討することが可能となってきた。このような様々なゲノムの化学変換は、生命科学の一層の発展に重要であると同時に、生成する改造ゲノムが超高機能素材としてさまざまな分野に幅広く応用され、関連分野に革新的な進展をもたらすことが期待される。

6. 謝辞

本稿で紹介した研究成果は、研究室のスタッフ、学生をはじめとする多くの共同研究者の方々の長年にわたる日々の努力の賜物であります。ここに心よりの謝意を表したいと思います。また長年にわたって研究をサポートいただいた文部科学省および日本学術振興会に感謝いたします。

参考文献

1. M. Komiyama, K. Yoshimoto, M. Sisido, K. Ariga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2017**, *90*, 967-1004.
2. X. Liang, H. Chen, L. Li, R. An, M. Komiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2021**, *94*, 141-157.
3. X. Liang, M. Liu, M. Komiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2021**, *94*, 1737-1756.
4. Y. Aiba, J. Sumaoka, M. Komiyama, *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, *40*, 5657-5668.
5. M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science*, **2012**, *337*, 816-821.
6. P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science*, **1991**, *254*, 1497-1500.
7. I. V. Kutyavin, R. L. Rhinehart, E. A. Lukhtanov, V. V. Gorn, R. B. Meyer, Jr., H. B. Gamper, Jr., *Biochemistry*, **1996**, *35*, 11170-11176.
8. M. Komiyama, Y. Aiba, T. Ishizuka, J. Sumaoka, *Nat. Protoc.*, **2008**, *3*, 646-654.
9. A. M. Geurts, G. J. Cost, Y. Freyvert, B. Zeitler, J. C. Miller, V. M. Choi, S. S. Jenkins, A. Wood, X. Cui, X. Meng, *Science*, **2009**, *325*, 433.
10. J. C. Miller, S. Tan, G. Qiao, K. A. Barlow, J. Wang, D. F. Xia, X. Meng, D. E. Paschon, E. Leung, S. J. Hinkley, *Nat. Biotechnol.*, **2011**, *29*, 143-148.
11. S. White, J. W. Szewczyk, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature*, **1998**, *391*, 468-471.
12. M. Komiyama, Y. Aiba, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, *Nat. Protoc.*, **2008**, *3*, 655-662.
13. W. Chen, Y. Kitamura, J.-M. Zhou, J. Sumaoka, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 10285-10291.
14. M. Komiyama, K. Ariga, *Mol. Catal.*, **2019**, *475*, 110492.
15. M. Komiyama, *Chem. Lett.*, **2016**, *45*, 1347-1355.
16. Y. Miyajima, T. Ishizuka, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 2657-2662.
17. Y. Yamamoto, A. Uehara, A. Watanabe, H. Aburatani, M. Komiyama, *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 673-677.
18. Y. Xu, K. Ito, Y. Suzuki, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 631-637.
19. T. Ishizuka, Y. Xu, M. Komiyama, *J. Am.*

- Chem. Soc.*, **2013**, 135, 14-17.
20. T. Ishizuka, M. Komiyama, and Y. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 7198-7202 (2012).
21. Y. Xu, Y. Suzuki, T. Lönnberg, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 2871-2874.
22. A. Rajendran, N. Shigi, J. Sumaoka, M. Komiyama, *Biochemistry*, **2018**, 57, 2908-2912.
23. X. Li, S. Muneoka, N. Shigi, J. Sumaoka, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 8674-8676.
24. H. Katada, H. J. Chen, N. Shigi, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **2009**, 6545-6547.
25. H. Katada, M. Komiyama, *Curr. Gene Ther.*, **2011**, 11, 38-45.
26. K. Ito, N. Shigi, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 6764-6766.
27. N. Shigi, J. Sumaoka, M. Komiyama, *Molecules*, **2017**, 22, 1586.
28. M. Tanaka, N. Shigi, J. Sumaoka, M. Komiyama, *RSC Adv.*, **2014**, 4, 63533-63538.
29. W. Kameshima, T. Ishizuka, M. Minoshima, M. Yamamoto, H. Sugiyama, Y. Xu, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 13681-13684.