ペプチド核酸(PNA)および その類縁体からなる機能性 人工核酸の合成と性質

岩瀬 礼子*
村上 章

*Synthesis, Properties and Functions of Peptide Nucleic Acids (PNA)
and Their Derivatives*

Reiko Iwase* and Akira Murakami

In 1991 Nielsen *et al.* first described peptide nucleic acid (PNA), which is a DNA mimic with a pseudopeptide backbone composed of *N*-(2-aminoethyl)glycine units with the nucleobases attached to the glycine nitrogen *via* carbonyl methylene linkers. PNA is a very attractive molecule as a DNA mimic because it shows high biological stability with strong binding-affinity to complementary DNA and RNA. The limitations of PNA include low aqueous solubility, ambiguity in DNA binding orientation and poor membrane permeability. Various PNA derivatives were reported to improve physicochemical and biological properties of PNA. Chirality was introduced into the achiral PNA backbone to influence the selectivity in DNA binding orientation. PNA backbone was rigidified by introduction of ring structure to preorganize PNA for duplex formation. This review focuses on the chemistry and biological activity of PNA, and gives an overview of backbone modifications of PNA.

Key words: peptide nucleic acids, PNA, bis-PNA, strand invasion, triple helix, antisense agents, antigene agents, molecular beacon, drug delivery

はじめに

遺伝子の塩基対形成能は、遺伝情報を正確に伝達する上で重要である。化学合成した核酸オリゴマーも、この性質により、塩基配列特異的に遺伝子と結合することができる。そのため合成核酸オリゴマーは、標的遺伝子の機能を制御したり、特定の遺伝子を検出するプローブとして用いられる。そこで、このような機能を生体内環境下でも十分に発揮させるため、化学修飾核酸の研究が数多く行われてきた¹⁻³⁾。ペプチド核酸(PNA)(1)は、DNAの糖-リン酸骨格を(2-アミノエチル)グリシンに置き換えた人工核酸で、1991年にNielsenらにより最初に報告された(図1)⁴⁻⁶⁾。このPNAは、核酸相補鎖と結合することができ^{7,8)}、しかも生体内環境下で安定に存在できる性質を持つ⁹⁾。従って、PNAは遺伝子の機能制御物質や検出プローブとしての応用を始めとして、その適用範囲が急速に広がりつつある現状にある¹⁰⁻¹⁶⁾。PNA以外に遺伝子制御に広く応用された代表的な人工核酸として、メチルホスホネート型DNA(2)、ホスホロチオエート型DNA(3)、2'-O-メチル型RNA(4)などが

Fig. 1 Structures of DNA, PNA and modified oligonucleotides.

ある(図1)¹⁻³⁾。

これらの人工核酸とは異なり、PNAは、バックボーン構造に糖環や負電荷を持たない。この構造上の違いにより、PNAは高い核酸分解酵素耐性を持ち、核酸相補鎖と安定な二重鎖および三重鎖を形成することが可能となっている。一方、PNAを遺伝子制御物質として用いる場合いくつかの弱点がある。PNAのバックボーン構造は核酸と比較してより柔軟であるため、PNAと核酸が二重鎖を形成する際、PNAのN末端と核酸の3'末端が相対するアンチパラレル型の結合と、PNAのN末端と核酸の5'末端が相対するパラレル型の結合の2種類が可能となる(図2)^{7,17)}。また、PNAが長鎖になると水溶性が低下することや¹⁸⁾、細胞膜に対する透過性が低いことなどの性質を示す¹⁹⁾。そこで、PNAを化学修飾する

* 京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科

* Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology ()

ことにより、これらの弱点を改善する研究が行われている^{20,21)}。本稿では、まず、PNA の合成と性質について概説し、次に、最近の PNA 類縁体とその核酸認識能に関する研究動向、そして、PNA による遺伝子制御や遺伝子検出への応用について紹介する。

Fig. 2 Schematic representation of PNA binding to complementary oligonucleotides.

1. ペプチド核酸(PNA)の合成とその性質

1.1 PNA の合成

PNA の合成は、まずペプチド合成に準じて Boc 法による固相合成が行われた^{4, 6, 22-24)}。核酸塩基部位の保護基にはベンジルオキシカルボニル(Cbz)基(表 1, entry 1, entry 2)、固相担体には正電荷を持つリシン残基を PNA の C 末端に結合させるために、リシン修飾 MBHA-ポリスチレン担体(5)(図 3(a))が用いられた。このリシンは、PNA の自己会合を防ぐためと、PNA の収率をアミノ酸分析で定量するために導入された。Boc 基の除去には、50% トリフルオロ酢酸/ジクロロメタン溶液が用いられ、PNA の担体からの切断と Cbz 基の除去には、HF

あるいはトリフルオロ酢酸/トリフルオロメタンスルホン酸が用いられた。最近、Boc 法での核酸塩基の保護基としてベンゾイル基やイソブチリル基を用いた PNA の合成が報告された(表 1, entry 3)²⁵⁾。この時、ベンゾイルアデニンを有する PNA モノマーの縮合反応をウロニウム系縮合剤の HATU(7)(図 3(b))とジイソプロピルエチルアミンを用いて行くと、核酸塩基部位に副反応が生じて縮合収率が低下した。そこで、ホスホニウム系縮合剤の PyAOP(8)(図 3(b))と *N*-メチルモルホリンを用いると縮合収率が改善された。この方法により PNA 17 量体を合成後、PAM-レジン(6)(図 3(a))からの切り出し、およびアシル型保護基の除去をアンモニア水またはメチルアミン水溶液で行い、全収率 68% で目的とする PNA が得られたと報告されている。

一方、Fmoc 法による PNA の合成が報告され、塩基部位の保護基には、酸性条件下で除去可能な Cbz 基²⁶⁾、ベンズヒドリルオキシカルボニル(Bhoc)基²⁷⁾、あるいはモノメトキシトリチル(Mmt)基²⁸⁾が用いられた(表 1, entry 4-6)。Fmoc 基の除去は、20% ピペリジン溶液で行われた。また、最終段階における Bhoc 基、および Mmt 基の除去は、トリフルオロ酢酸が用いられた。さらに緩和な条件下で PNA を合成する方法として、*N*-末端の保護基に Mmt 基、核酸塩基部位の保護基にアニソイル基やイソブチリル基を用いる方法が報告された

Table 1 Structures of PNA monomers with protecting groups and the deprotection methods.

entry	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	deprotection method		ref.
						R	R ₁ ~ R ₄	
1	Boc	Cbz	Cbz	H	—	50% TFA	HF	22
2	Boc	Cbz	Cbz	—	Cbz	50% TFA	TFA/TFMSA	24
3	Boc	Bz	Bz	isobutyryl	—	50% TFA	NH ₃ or CH ₃ NH ₂	25
4	Fmoc	Cbz	Cbz	—	Cbz	30% piperidine	HF	26
5	Fmoc	Bhoc	Bhoc	—	Bhoc	20% piperidine	TFA	27
6	Fmoc	Mmt	Mmt	—	Mmt	20% piperidine	TFA	28
7	Mmt	Anisoyl	Anisoyl	—	isobutyryl	3% Cl ₃ CCOOH	NH ₃	29

Boc: *tert*-butoxycarbonyl; Fmoc: 9-fluorenylmethoxycarbonyl; Cbz: benzyloxycarbonyl; Bz: benzoyl; Bhoc: benzhydryloxycarbonyl; Mmt: 4-methoxyphenyldiphenylmethyl; TFA: trifluoroacetic acid; TFMSA: trifluoromethanesulfonic acid

Fig. 3 (a) Structures of polymer supports. MBHA: (4-methylbenzhydryl)amine; PAM: 4-hydroxymethylphenylacetic acid. (b) Structures of condensing reagents. HATU: *N*-[(dimethylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridine-1-ylmethylene]-*N*-methylmethanaminium hexafluorophosphate *N*-oxide; PyAOP: (7-azabenzotriazol-1-yl)oxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate.

(表 1, entry 7)²⁹⁾。この PNA 合成法は、DNA の固相合成で用いる保護基の組み合わせと一致しており、PNA/DNA キメラオリゴマーの合成に用いられた¹⁷⁾。

1.2 PNA の性質

1.2.1 PNA の核酸に対する結合性

Nielsen らは、当初 PNA を DNA 二重鎖と Hoogsteen 塩基対(図 4(b))で結合して三重鎖を形成する物質として設計した。そして、チミン塩基を持つ PNA 10 量体(T₁₀, C 末端にリシン, N 末端にアクリジンを含む)を合成して、デオキシアデノシンの 10 量体(dA₁₀)領域を持つ DNA 二重鎖との結合を検討した⁴⁾。その結果、予期に反して PNA は dA₁₀ 領域と Watson-Crick 塩基対(図 4(a))で結合する一方、dA₁₀ 領域と結合していたチミジン 10 量体領域は 1 本鎖状態に変化することが見出された⁴⁾。この PNA の結合の仕方は、ストランドインバージョンと呼ばれている。その後の数々の研究から、PNA と DNA 二重鎖の結合は以下に示す 4 つの形式が知られている^{13,21)}。

- (1) PNA が DNA 二重鎖と Hoogsteen 塩基対で結合した三重鎖(Triplex)(表 2, entry 1): PNA がシトシン塩基を多く含むピリミジン配列からなる場合に生じる³⁰⁾。
- (2) 侵入型三重鎖(Triplex invasion)(表 2, entry 2):ピリミジン配列を持つ PNA 2 本が、相補的なプリン配列の DNA 鎖に対して、Watson-Crick 塩基対、および Hoogsteen 塩基対を形成し、PNA-DNA-PNA の三重鎖を生じる^{4,31)}。
- (3) 侵入型二重鎖(Duplex invasion)(表 2, entry 4): PNA が DNA 相補鎖と Watson-Crick 塩基対を形成して二重鎖を生じる。この二重鎖形成は、PNA

がプリン塩基配列の場合に生じやすい³²⁾。PNA のアデニン塩基を 2,6-ジアミノプリン塩基(9)(図 5(a))に置き換えると、アデニン-チミン塩基対(図 4(a))の水素結合数が 1 本増加し、DNA-PNA 二重鎖の安定性は向上する³²⁾。

- (4) 二重侵入型二重鎖(Double duplex invasion)(表 2, entry 5): 相補的な塩基配列を持つ 2 種類の PNA が、標的 DNA 二重鎖の同一領域に対して、それぞれ Watson-Crick 塩基対を形成し 2 つの二重鎖を生じる³³⁾。相補的な PNA が互いに二重鎖を形成しないように、PNA のアデニン塩基を 2,6-ジアミノプリン、チミン塩基を 2-チオウラシル(10)(図 5(b))に変え、立体障害により PNA・PNA 二重鎖の形成を抑制した PNA 誘導体が用いられる。

核酸による三重鎖の形成は、pH の影響を受ける。これは、Hoogsteen 塩基対で結合する核酸塩基がシトシン塩基の場合、その N3 位(pKa 4.5)がプロトン化して水素結合形成が可能になると、三重鎖がより安定化するためである(図 4(b))。そこで、シトシン塩基をシュードイソシトシン(11)(図 5(c))に置き換えると、中性条件下でもグアニン塩基部 7 位の窒素原子と水素結合を形成するため、三重鎖の安定性が pH に依存しなくなることが報告されている^{34,35)}。PNA-DNA-PNA 型の三重鎖についても pH 依存性を解消するために、Hoogsteen 塩基対で結合する PNA にシュードシトシン塩基が組み込まれた。そして、Watson-Crick 塩基対で結合する PNA とシュードイソシトシンを含み Hoogsteen 塩基対で結合する PNA をリンカーで連結したビス-PNA(表 2, entry 3)が合成された³⁶⁾。このビス-PNA は、中性条件下で安

Fig. 4 (a) Watson-Crick base pairing of A-T and G-C. (b) Chemical structures of Hoogsteen base pairing.

Fig. 5 (a) Watson-Crick base pairing of 2,6-diaminopurine-T³¹⁾. (b) Watson-Crick base pairing of 2,6-diaminopurine-2-thiouracil³²⁾. (c) Chemical structure of pseudoisocytosine and the formation of Hoogsteen base pairing³⁵⁾.

Table 2 PNA binding modes upon targeting double stranded DNA or single stranded oligonucleotide¹³⁾.

entry	target of PNA	binding mode	sequence of PNA	sequence of target
1	DNA duplex	Triplex	C rich homopyrimidine PNA	homopurine · homopyrimidine duplex
2		Triplex invasion	homopyrimidine PNA	homopurine · homopyrimidine duplex
3		Triplex invasion with bis-PNA	homopyrimidine PNA	homopurine · homopyrimidine duplex
4		Duplex invasion	homopurine PNA	homopurine · homopyrimidine duplex
5		Double duplex invasion	pseudo complementary PNAs with modified nucleobases	mixed sequence with purine and pyrimidine
<hr/>				
6	Single stranded oligonucleotide	Duplex	mixed sequence with purine and pyrimidine	mixed sequence with purine and pyrimidine
7		Triplex	homopyrimidine PNA	homopurine sequence
8		Triplex with bis-PNA	homopyrimidine PNA	homopurine sequence

定に PNA-DNA-PNA 型の三重鎖を形成する。

さて、PNA と一本鎖核酸の結合についても、上記の DNA 二重鎖との結合の場合と同様に、二重鎖あるいは三重鎖の形成が起こる(表 2, entry 6-8)。二重鎖形成では、標的核酸の塩基配列に制限はない。一方、三重鎖形成は、プリン塩基配列の核酸に対して起こる。シュードイソシトシンを含むビス-PNA は、一本鎖核酸に対しても三重鎖を形成することができる。

1.2.2 PNA の化学的、生化学的性質

PNA は、遺伝子の機能制御や検出に応用する上で、次のような利点を持つ。

- (1) 核酸分解酵素やタンパク質分解酵素に耐性があり、ヒト血清や細胞抽出液中で安定に存在する⁹⁾。
- (2) バックボーンに電荷がないため、負電荷を帯びた核酸相補鎖と結合する際に電荷反発がない。
- (3) PNA と核酸の二重鎖構造の安定性は、核酸・核酸二重鎖よりも高い^{7,8)}。
- (4) PNA と DNA の二重鎖構造の安定性は、イオン濃度に影響されにくい。そして、核酸二重鎖を不安定化するような低イオン濃度の条件下でも二重鎖構造を維持する性質を持つ³⁷⁾。
- (5) PNA は核酸相補鎖と塩基配列選択的に結合する。すなわち、ミスマッチ塩基対を含む PNA と核酸の二重鎖は、完全に相補的な PNA と核酸の二重鎖と比較して明らかに不安定化する⁶⁾。

一方、PNA を細胞内の遺伝子制御に用いる場合、次のような弱点がある。

- (1) PNA と核酸の結合方向性: 核酸二重鎖は、5'末端と 3'末端が相対するアンチパラレル型の方向性で二重鎖を形成する。一方、PNA は、パラレル型とアンチパラレル型の 2 種類の結合が可能である(図 2)^{7,17)}。アンチパラレル型二重鎖の方が、パラレル型二重鎖よりも安定性が高い傾向を示す。
- (2) RNaseH に対する非感受性: RNaseH という RNA 切断酵素は、DNA・RNA 二重鎖に結合して、RNA を切断する性質を持つ。一方、PNA・RNA 二重鎖は RNaseH の作用を受けない。すなわち、PNA が mRNA と結合した際、RNaseH は mRNA を切断する作用を示さない³⁸⁾。
- (3) PNA のバックボーンに電荷がないため、鎖長が長くなると水溶性が低下する¹⁸⁾。
- (4) PNA は、細胞膜透過性に乏しい¹⁹⁾。

これらの問題点を改善することを目的として、PNA の化学修飾が検討されている。次に、PNA の機能改善を目指した PNA 誘導体の研究と、PNA の応用例について解説する。

2. PNA のコンホメーション規制による核酸結合性に関する改善

PNA のコンホメーションが、アンチパラレル型の PNA・核酸二重鎖を形成しやすい構造にあらかじめ規制されていれば、アンチパラレル型二重鎖を優先して形成すると期待される³⁹⁾。また、このように PNA のコンホメーションが規制されると、PNA と核酸の二重鎖形成

のエントロピー減少量が小さくなり、二重鎖の安定化の増加に寄与することが期待できる²⁰⁾。これまで、PNAのコンホメーションを規制するために、環構造や二重結合を導入したPNA誘導体が報告されている。ここでは、これらのコンホメーションを規制したPNA誘導体の構造と、核酸相補鎖に対する結合性について紹介する。

2.1 4-アミノプロリル型 PNA

Ganesh^{39, 40)}やJordan⁴¹⁾らは、PNAのアミノエチル部位の β -炭素とグリシン部位の α -炭素をメチレン基で架橋したD-*trans*-4-アミノプロリル型PNA(12)(図6)を合成した。まず、PNA 13量体の鎖中1カ所に12のモノマーを導入した修飾PNA(PNA 1, 表3, entry 1)を合成した。そして、PNA 1とDNA相補鎖とのアンチパラレル型二重鎖が50%解離する温度(T_m 値)を測定した。この T_m 値は、二重鎖の安定性の指標となり、値が大きいほど二重鎖構造が安定であることを示す。この二重鎖の T_m 値は33.5℃となり、未修飾PNA・DNA二重鎖の T_m 値より5.5度増加した(表3, entry 1-2)。一方、PNA 1は未修飾のコントロールPNA 1と異なり、パラレル型二重鎖の T_m 値が観測されなかった。以上の結果から、12のモノマーをPNAの鎖中に1カ所導入すると、よりアンチパラレル方向で結合しやすくなることが示された。これは、12のモノマーにおけるコンホメーションが、PNA・DNAアンチパラレル型二重鎖に適合していることを示唆している。しかしながら、12のみ

からなる6量体(T_{AP6})とDNA相補鎖による T_m 値は観測されなかった。この結果は、12のみからなるオリゴマーの場合、バックボーンのコンホメーションの制限が過剰になり、DNAとの結合に適合しなかったことを示唆している。

2.2 アミノエチルプロリル型 PNA

Ganeshらは、次に、PNAのグリシン部位をプロリンに変えてバックボーンと核酸塩基部位の立体配置に制限を加える一方、アミノエチル部位は修飾せず柔軟性を残した(2*S*, 4*S*)-アミノエチルプロリル型PNA(13)を合成した^{42, 43)}。PNA 10量体の鎖中1カ所に13のモノマーを導入したPNA 2(表3, entry 3)の場合、DNAとのアンチパラレル型二重鎖の T_m 値は、未修飾のコントロールPNA 2よりも約13度上昇した(表3, entry 3-4)。また、PNA 2・DNA二重鎖の T_m 値は、アンチパラレル型結合の方がパラレル型結合よりも約23度上昇した(表3, entry 3)。従って、13のモノマーのコンホメーションは、12と同様にPNA・DNAアンチパラレル型二重鎖に適合し、DNAとアンチパラレル方向でより結合しやすい性質を持つことがわかった。しかしながら、プリン塩基を持つ13のモノマーをPNA鎖中に導入した場合、DNAとのパラレル型二重鎖も安定化した。これは、13のモノマー上の核酸塩基の種類に依存して環構造のコンホメーションや核酸塩基の配向性が異なることを示唆している。一方、アデニン塩基を持つ13(A_{AEP})のみからなる12量体(A_{AEP12})について、DNAとの二重鎖の T_m 値が検討され、未修飾DNA・DNA二重鎖よりも18度上昇することがわかった⁴⁴⁾。これは、13のオリゴマーのバックボーンのコンホメーションがDNAとの安定な二重鎖の形成に適応していることを示唆している。

Fig. 6 Structures of conformationally restricted PNA analogues.

Fig. 7 Structures of OPNA, DNG/PNA chimera and PNA/DNA chimera^{17, 54-58)}.

2.3 シクロヘキサン環の導入

Nielsen らは、PNA のバックボーンのアミノエチル部位のコンホメーションをシクロヘキシル環で規制したシクロヘキシル PNA (14) を合成した⁴⁵⁾。そして、PNA 10 量体の 3 カ所を 14 のモノマーと置換して、DNA とのアンチパラレル型二重鎖の安定性を検討した (表 3, entry 5-7)。その結果、(S,S)-型の 14 モノマー (T_{SS}) を導入した PNA 3 は、(R,R)-型の 14 モノマー (T_{RR}) を導入した PNA 4 よりも T_m 値が約 18 度上昇した。さらに熱力学的パラメータを検討した結果、PNA 3 と DNA の二重鎖形成のエントロピー変化量は、PNA 4 の場合よりも小さくなった。これより、(S,S)-型の 14 モノマーのコンホメーションは、(R,R)-型の 14 モノマーのコンホメーションよりも、DNA との二重鎖を安定化する効果が高いことが示唆された。次に (S,S)-型の 14 のみからなる PNA 5 (表 3, entry 8) と DNA の二重鎖の T_m 値を検討した結果、アンチパラレル型二重鎖を形成する一方、パラレル型二重鎖の形成は観測されなかった。従って、(S,S)-型の 14 が連続したオリゴマーのコンホメーションは、DNA とのアンチパラレル型二重鎖に合致していることが示唆された。しかしながら、その T_m 値は未修飾 PNA・DNA 二重鎖の T_m 値より 14 度低下したことから、核酸塩基間相互作用などが不十分で二重鎖が不安定化していることが示唆された。

2.4 オレフィンを導入した PNA (OPA)

PNA と核酸のアンチパラレル型二重鎖では、核酸塩基とバックボーンを連結するアミド構造のカルボニル基の向きが C 末端側に制限されていることが、NMR や X

線結晶解析から明らかにされている⁴⁶⁻⁴⁹⁾。そこで、Leumann らは、このアミド構造のコンホメーションに制限を加えるため、オレフィン構造に置換した *E*-オレフィン型 PNA ((*E*)-OPA) (15) と *Z*-オレフィン型 PNA ((*Z*)-OPA) (16) を合成した^{50,51)}。PNA の鎖中央 1 カ所に (*E*)-OPA モノマーを導入した PNA 6 は、DNA との二重鎖の T_m 値が 39.9 °C となり、(*Z*)-OPA モノマーを導入した PNA 7 よりも約 8 度上昇した (表 3, entry 9-10)⁵¹⁾。これより、(*E*)-OPA モノマーのコンホメーションの方が PNA・DNA アンチパラレル型二重鎖により適合することが示唆された。しかしながら、(*E*)-OPA が連続した PNA 8 では、DNA 相補鎖とパラレル型二重鎖のみを形成した (表 3, entry 12)。これより PNA 上の核酸塩基の立体配座よりも、核酸塩基とバックボーン間にあるアミド構造のカルボニル基の方がアンチパラレル方向での結合形成に及ぼす影響が大きいことが示唆された。

2.5 ピロリジノン PNA, ピロリジン PNA

Nielsen らは、ピロリジノン環を持つ PNA 誘導体 (ピロリジノン PNA) (17) を合成した⁵²⁾。PNA の鎖中央 1 カ所に (3*S*, 5*R*)-ピロリジノン PNA のモノマーを導入した PNA 9 (表 3, entry 14) は、DNA よりも RNA とより安定な二重鎖を形成することが T_m 値の測定からわかった。これより、17 のモノマーのコンホメーションが PNA・RNA 二重鎖の構造により合致することが示唆された。しかしながら、PNA 9 は未修飾 PNA と比較して DNA や RNA に対する T_m 値が低下したことから、この修飾 PNA のコンホメーションは二重鎖構造に最適化されたものではないことが示唆された (表 3, entry 14,

Table 3 Thermal stabilities (T_m [°C]) of PNA/DNA duplexes and PNA/RNA duplexes containing conformationally restricted PNA analogues^{40,43,45,51,53)}.

entry	modified PNA	sequence	T _m (°C)			ref.
			antiparallel orientation	parallel orientation	antiparallel orientation	
1	D-trans-4-aminopropyl PNA (T _{AP})	PNA 1	H-CTCT _{AP} TATTATT-CONH(CH ₂) ₂ COOH	33.5	nd	40
2		control PNA 1	H-CTCTATTATTATT-CONH(CH ₂) ₂ COOH	28	27.5	
3	(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-1-aminoethylpropyl-PNA (T _{AEP})	PNA 2	H-GTAGAT _{AEP} CACT-CONH(CH ₂) ₂ COOH	56.6	34.0	43
4		control PNA 2	H-GTAGATCACT-CONH(CH ₂) ₂ COOH	43.8	40.3	
5	(<i>S</i> , <i>S</i>)-cyclohexyl PNA (T _{SS})	PNA 3	H-GT _{SS} AGAT _{SS} CACT _{SS} -Lys-NH ₂	51	41	45
6	(<i>R</i> , <i>R</i>)-cyclohexyl PNA (T _{RR})	PNA 4	H-GT _{RR} AGAT _{RR} CACT _{RR} -Lys-NH ₂	33.5	nd	
7		control PNA 3	H-GTAGATCACT-Lys-NH ₂	55	38	
8		PNA 5	H-(GTAGATCACT) _{SS} -Lys-NH ₂	41	nd	
9	(<i>E</i>)-OPA (T _E)	PNA 6	IGTAGAT _E CACT-hex	39.9		51
10	(<i>Z</i>)-OPA (T _Z)	PNA 7	IGTAGAT _Z CACT-hex	32.2		
11		control PNA 6	IGTAGATCACT-hex	46.4		
12	(<i>E</i>)-OPA (T _E A _E)	PNA 8	Q(TTTTAATATA) _E -Gly-NH ₂	<0	16.0	
13		control PNA 8	CTTTTAATATA-Gly-NH ₂	29.4	13.1	
14	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-pyrrolidinone PNA (A [*])	PNA 9	H-TACTCATA [*] CTCT-Lys-NH ₂	41.0		53
15	(2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-pyrrolidine PNA (A [#])	PNA 10	H-TACTCATA [#] CTCT-Lys-NH ₂	28.5		
16		control PNA 9	H-TACTCATACTCT-Lys-NH ₂	49.5	59.5	

I: Thymidine, Q: Deoxycytidine

16)。なお、17のみからなる10量体の修飾PNA ($H-A^*_{10}-Lys-NH_2$)はRNA相補鎖とPNA₂-RNAの特異な三重鎖を形成することが見出された。これは、未修飾PNAの場合RNAと二重鎖を形成することと異なる性質である。

Nielsenらは、17のピロリジノン環のカルボニル基を還元した(2*R*, 4*S*)型ピロリジジンPNA(18)を合成して、そのモノマーをPNA鎖に1カ所導入した(PNA 10, 表3, entry 15)⁵³⁾。その結果、DNAやRNAとの二重鎖の安定性が、17を導入した場合より大きく低下した(表3, entry 14-15)。これより、17のピロリジノン環のカルボニル基が核酸との二重鎖の安定化に寄与していることが示唆される。なお、18のみからなる10量体の修飾PNA ($H-A^{\#}_{10}-Lys-NH_2$)はDNA相補鎖と高い安定性を持つ特異なDNA₂-PNA型の三重鎖を形成した。これは、DNA₂-PNAの組み合わせによる三重鎖形成の初めての例である。

以上を総括すると、12あるいは13のモノマーをPNA鎖中に1カ所導入した修飾PNAが、コンホメーションを規制したPNAとして、アンチパラレル型二重鎖の形成を優先させ、その二重鎖を安定化するのに効果的であると言える。一方、コンホメーションを規制した修飾PNAモノマーをオリゴマー化すると、コンホメーション規制が過剰になる場合が多く、未修飾PNAと異なる結合特性を示す傾向があると言える。今後、さらに各種塩基を含む配列で核酸相補鎖との結合性を検討する必要があると思われる。

3. その他のPNA誘導体によるPNAの性質の改善

PNAにエーテル結合や極性基を導入することにより、PNAの水溶性の改善が行われた。また、PNAにDNAを連結してその性質を付与することにより、PNAの弱点を改善することが検討された。これらのPNA誘導体の構造と性質について紹介する。

3.1 オキシペプチド核酸(OPNA)

宍戸らは、*O*-アミノエチルグリコール酸をバックボーンとするオキシペプチド核酸(OPNA)(19)(図7)を合成した^{54, 55)}。OPNAは、PNAと異なりバックボーンにエーテル結合を含む。そのため、OPNAの水溶性はPNAより約2倍に増加した⁵⁵⁾。また、OPNA・DNA二重鎖は、PNA・DNA二重鎖やDNA・DNA二重鎖の場合よりも狭い温度範囲で解離する性質を持つことが見出された^{54, 55)}。これは、OPNAが、完全相補鎖と結合し、一塩基ミスマッチ塩基を含む相補鎖と結合しない温度条件を設定可能な塩基配列特異性を持つことを示唆している⁵⁴⁾。

3.2 PNA-グアニジン型DNA(DNG)キメラオリゴマー

Bruiceらは、PNAの鎖中に、糖、核酸塩基、そしてグアニジニウム基からなるグアニジン型DNA(DNG)モノマーを導入したDNG/PNAキメラオリゴマー(20)を合成した⁵⁶⁾。チミンPNA 10量体の両末端をDNGに変換すると、DNA相補鎖との三重鎖形成速度が増加することが見出された。また、この修飾PNAは、DNA二重鎖に対して鎖侵入型三重鎖を形成し、その結合速度が未修飾PNAの場合より増加することがわかった。これは、PNAに導入したグアニジニウム基の正電荷とDNAの静電的相互作用により、PNAとDNAとの三重鎖形成が促進されたと考えられる。

3.3 PNA/DNAキメラオリゴマー

PNAにDNAオリゴマーを連結したPNA/DNAキメラオリゴマー(21)が合成され、PNAの弱点の改善が検討された^{17, 57)}。DNA/PNAキメラオリゴマーと核酸の二重鎖の結合方向性は、パラレル型よりもアンチパラレル型の方が著しく安定化した。また、DNA/PNAキメラオリゴマーは、DNAの場合と同程度に細胞内に取り込まれることがわかった。さらに、DNA/PNAキメラオリゴマーによるmRNAの機能阻害作用が、RNaseHの添加によって著しく促進されることが見出された⁵⁸⁾。これは、PNAに連結したDNA部分で、RNaseHによるRNA切断機能が働いたことを示唆している。

以上をまとめると、(1)PNAの水溶性は、エーテル結合や極性基を導入すると改善されること、(2)PNAとDNAの結合速度は、PNAに正電荷を持つ構造を導入すると増加すること、(3)PNAにDNAを連結すると種々のPNAの弱点を補えること、が示された。

4. PNAによる遺伝子制御と遺伝子検出

PNAを、遺伝子制御物質として、あるいは、遺伝子検出プローブとして応用した研究例について紹介する。

4.1 PNAによるmRNAの機能制御

4.1.1 PNAによるmRNAの機能制御のメカニズム

PNAは、mRNAと二重鎖および三重鎖を形成して、そのmRNAの翻訳機能を抑制すると考えられている(図8)³⁸⁾。具体的には、(1)PNAがmRNAの開始コドン付近に結合して、リボソームのmRNA上への結合を阻害し、翻訳開始を抑制する機構(図8(a))、(2)PNAがmRNA上の翻訳領域に結合して、リボソームの移動を阻害し、翻訳を中断する機構(図8(b))、が提唱されている³⁸⁾。PNAがmRNAと三重鎖を形成するための標的部位は、プリン塩基が連続した領域に限られる。このプリン塩基領域が6塩基長と短い場合でも、三重鎖と二重鎖の形成が同時に可能なクランプPNA(22)(図8

(b))を用いると、翻訳阻害できることが報告されている³⁸⁾。三重鎖形成による mRNA の機能阻害は、PNA 特有の性質と言える。

Fig. 8 Inhibition of translation of mRNA by PNA.

4.1.2 PNA の細胞内導入

PNA は大腸菌に取り込まれにくい⁵⁹⁾、細胞壁透過性の正電荷を帯びたペプチド $[(\text{Lys-Phe-Phe})_3\text{Lys}]^{60)}$ を PNA に連結すると (23) (図 9)、大腸菌への取り込みが改善されることが報告された⁶¹⁾。さらに、23 を用いて β -ガラクトシダーゼ遺伝子の mRNA の発現抑制が検討された結果、未修飾 PNA よりも約 20 倍発現阻害効果が高いことが見出された。

Fig. 9 Cellular transporter peptides and peptide-PNA constructs⁶¹⁻⁶⁴⁾.

PNA の真核細胞への取り込みの改善にも、細胞膜透過性ペプチドの transportan (24)⁶²⁾ や pAntp (25)⁶³⁾ が用いられた⁶⁴⁾。これらのペプチドは、正電荷を持つアミノ酸側鎖が複数あり、細胞膜上の負電荷と静電的相互作用が可能である。これらのペプチドと PNA をジスルフィド結合で連結した誘導体 (26, 27) (図 9) を用いて、PNA の細胞内導入と神経ペプチド (galanin) レセプターの mRNA の発現抑制が検討された結果、未修飾 PNA より極めて低濃度で mRNA の発現を抑制することが見出された。これより、PNA に細胞膜透過性ペプチドを連結

すると、PNA の細胞内導入と遺伝子制御の効率の改善に有効であることが示された。

4.1.3 PNA による mRNA タンパク質相互作用の阻害

ヒト免疫不全症ウイルス (HIV) に感染した細胞では、ウイルス mRNA の転写が、その mRNA の先端部分のヘアピン構造 (TAR RNA) とウイルスタンパク質 Tat の複合体により促進されている (図 10, ルート A)。ここで、TAR RNA とそれに相補的な PNA を結合させると、TAR RNA と Tat の複合体形成が抑制されることが見出された (図 10, ルート B)⁶⁵⁾。さらに、この PNA と膜透過性ペプチド (transportan) の連結体を用いると、HIV 感染細胞における HIV の増殖を抑制できることが明らかにされた⁶⁶⁾。これらの結果は、PNA が RNA-タンパク質相互作用の阻害に有効であることを示唆している。

Fig. 10 Efficient transcription of HIV DNA by TAR RNA-Tat interaction (route A) and inhibition of the transcription by anti-TAR PNA (route B)⁶⁵⁾.

4.1.4 PNA による RNA タンパク質複合体の機能阻害

ガン細胞では、テロメラーゼという RNA 含有タンパク質によって、遺伝子末端のテロメアという特定塩基配列の繰り返し部位の欠落を修復する機構が活発に働いている (図 11(a))。そして、このテロメアの修復が、ガン細胞の異常増殖に関与していると考えられている。テロメラーゼ内の RNA 成分 (テロメラーゼ RNA) は、遺伝子のテロメア領域に結合して、それを修復する鋳型として機能する (図 11(a))⁶⁷⁾。このテロメラーゼ RNA に相補的な PNA は、テロメラーゼ RNA と結合して、テロメアの修復を抑制することが報告された⁶⁸⁾。さらに、ガン細胞への PNA の導入に、PNA-DNA 二重鎖とカチオン性脂質 (リポフェクトアミン) の複合体が用いられた (図 11(b))⁶⁹⁾。この複合体からの PNA の遊離は、細胞内で DNA 相補鎖が核酸分解酵素により分解されることにより起こる。この PNA 複合体により PNA の細胞内取り込みが改善され、ガン細胞の増殖が顕著に抑制されたと報告された。以上より、PNA は、RNA 含有タンパク質の機能制御にも有効であることが示唆された。

Fig. 11 (a) Extension of telomere DNA by telomerase and inhibition of the extension by PNA^{67,68}. (b) PNA-DNA-cationic lipid complex⁶⁹.

4.2 DNA を標的とした PNA の生理活性

PNA を細胞核内の DNA 二重鎖に鎖侵入的に結合 (トランスインベージョン) させ、DNA の転写を抑制する方法が検討された (図 12)⁷⁰。まず、PNA の核内導入を促進するため、PNA に核移行シグナルペプチド (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val) が連結された。このペプチドは、トランスポーチンというタンパク質と結合して、核内へ輸送される性質がある。c-myc ガン遺伝子に相補的な PNA (TCAACGTTAGCTTCACC) と核移行シグナルペ

Fig. 12 Nuclear transport of peptide-PNA construct and the strand invasion to c-myc DNA⁷⁰.

チドの連結体を用いると、核内の PNA 量が増加し、c-myc 遺伝子の転写が抑制された。これより、DNA の転写活性化部位は PNA によりストランドインベージョンされやすく、通常のプリン塩基とピリミジン塩基の混合配列の PNA によっても、DNA 二重鎖に対する侵入型 PNA-DNA 二重鎖の形成が可能であることが示唆された。

4.3 PNA による遺伝子の検出

標的遺伝子の存在を簡便に検出する方法の開発は、遺伝子診断や遺伝子機能解析において有用である。標的遺伝子を均一溶液中で検出する方法の 1 つに、モレキ

Fig. 13 (a) Schematics of molecular beacon⁷²⁻⁷⁵. (b) Schematic representation of the detection of DNA by molecular beacon. (c) Schematic representation of hybridization of bis-PNAs to DNA duplex, followed by the detection of the DNA by molecular beacon^{74,75}.

ラービーコン⁷¹という蛍光標識 DNA プロブを用いる方法がある。この DNA プロブは、蛍光剤と消光剤を併せ持ち、これらが近接して蛍光消光状態にある (図 13(a))。このプロブが DNA 相補鎖と二重鎖を形成すると、蛍光剤と消光剤の距離が離れて蛍光発光が生じ、結合した DNA 相補鎖の存在を検出できる (図 13(b))。PNA は、核酸分解酵素耐性に優れ、相補鎖と安定な二重鎖を形成するため、ヘアピン構造 (28)⁷² や非ヘアピン構造 (29) (図 13(a))⁷³⁻⁷⁵ の PNA モレキュラービーコンが開発された。PNA モレキュラービーコンの特徴は、低塩濃度の条件下でも標的 DNA と速やかに結合することである⁷⁵。これは、PNA のバックボーン構造が無電荷であるため、PNA モレキュラービーコンの二次構造や DNA との二重鎖形成能が塩濃度の影響を受けにくいことに起因している。また、標的 DNA が二重鎖の場合でも、ビス PNA を利用して DNA 二重鎖を解離させ、PNA モレキュラービーコンにより検出できることが報告された (図 13(c))^{74,75}。しかしながら、ビス PNA の結合部位はポリプリン配列に限られるため、その適用範囲は制限される。

低分子化合物とタンパク質との相互作用を PNA と DNA の二重鎖形成を利用して蛍光検出する方法が報告

Fig. 14 Schematic representation of detection of protein-inhibitor interactions by the binding of the complexes to an oligonucleotide array⁷⁶⁾.

された⁷⁶⁾。Schultsらは、タンパク質阻害剤であるペプチドにPNAとフルオレセインを連結した誘導体(30)を合成した(図14)。次に、この誘導体とタンパク質を混合して、生成したタンパク質-阻害剤-PNA-フルオレセイン複合体(31)を、排除クロマトグラフィーによって精製後、基板上に固定化したDNAに作用させた。その結果、31はDNA相補鎖と結合して、基板上的特定位置で蛍光発光を示した。阻害剤の種類とPNAの塩基配列を1対1対応させると、複数のタンパク質-阻害剤相互作用を、DNAを固定した基板上で一挙に蛍光検出することが可能である。遺伝子から発現される多種類のタンパク質を解析する方法として応用が期待される。

おわりに

PNAの重要な特徴は、標的核酸と安定な二重鎖および三重鎖を形成し、かつ、生体内環境下で極めて高い分解耐性を示すことである。そして、PNAの化学修飾によって、塩基配列特異的結合性、水溶性、細胞膜透過性などが向上することが様々な研究により示された。さらに、修飾PNAの細胞内への積極的導入により、PNAが遺伝子制御やタンパク質-核酸相互作用の制御に有効であることが明らかにされた。近年は、PNAと核酸の安定な結合性を利用して、新規な機能性物質を創成する研究^{76, 77)}が活発化しており、PNAの応用研究は今後も広く展開されると期待される。

(2002年7月8日受理)

文 献

- 1) 村上章, 牧野圭祐, 有合化, 48, 180 (1990)
- 2) E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.*, 90, 543 (1990)
- 3) 岩瀬礼子, 山岡哲二, 村上章, *Antisense*, 5, 17 (2001)
- 4) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science*, 254, 1497 (1991)
- 5) M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 9677 (1992)
- 6) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1895 (1992)
- 7) M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E.

- Nielsen, *Nature*, 365, 566 (1993)
- 8) K. K. Jensen, H. Oerum, P. E. Nielsen, B. Norden, *Biochemistry*, 36, 5072 (1997)
- 9) V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sonnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.*, 48, 1310 (1994)
- 10) E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 37, 2796 (1998)
- 11) H. J. Larsen, T. Bentin, P. E. Nielsen, *Biochem. Biophys. Acta*, 1489, 159 (1999)
- 12) A. Ray, B. Norden, *FASEB J.*, 14, 1041 (2000)
- 13) P. E. Nielsen, *Current Medicinal Chemistry*, 8, 545 (2001)
- 14) D. A. Braasch, D. R. Corey, *Biochemistry*, 41, 4503 (2002)
- 15) V. V. Demidov, *Drug Discovery Today*, 7, 153 (2002)
- 16) H. Stender, M. Fiandaca, J. J. Hyldig-Nielsen, J. Coull, *J. Microbiol. Methods*, 48, 1 (2002)
- 17) E. Uhlmann, D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, A. Rytte, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 35, 2632 (1996)
- 18) B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.*, 4, 5 (1996)
- 19) P. Wittung, J. Kajanous, K. Edwards, G. Haaima, P. E. Nielsen, B. Norden, B.G. Malmston, *FEBS Lett.*, 375, 27 (1995)
- 20) P. E. Nielsen, G. Haaima, *Chem. Soc. Rev.*, 73 (1997)
- 21) K. N. Ganesh, P. E. Nielsen, *Current Organic Chemistry*, 4, 931 (2000)
- 22) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpus, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.*, 59, 5767 (1994)
- 23) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Pept. Sci.*, 1, 175 (1995)
- 24) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Ørum, *J. Pept. Res.*, 49, 80 (1997)
- 25) T. Kofoed, H. F. Hansen, H. Ørum, T. Koch, *J. Peptide Sci.*, 7, 402 (2001)
- 26) S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A. Noble, *Tetrahedron*, 51, 6179 (1995)
- 27) T. E. Goodwin, R. D. Holland, J. O. Lay, Jr, K. D. Raney, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 2231 (1998)
- 28) G. Breipohl, J. Knolle, D. Langner, G. O' Malley, E. Uhlmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6, 665 (1996)
- 29) D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, *Tetrahedron*, 51, 12069 (1995)
- 30) P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Nordén, *Biochemistry*, 36, 7973 (1997)
- 31) D. Y. Cherny, B. P. Belotserkovskii, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, R. H. Berg, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1667 (1993)
- 32) P. E. Nielsen, L. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 2287 (1996)
- 33) J. Lohse, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

- 96, 11804 (1999)
- 34) A. Ono, P. O. P. Ts'o, L. J. Kan, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4032 (1991)
 - 35) A. Ono, P. O. P. Ts'o, L. J. Kan, *J. Org. Chem.*, **57**, 3225 (1992)
 - 36) M. Egholm, L. Christensen, K. L. Dueholm, O. Buchardt, J. Coull, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.*, **23**, 217 (1995)
 - 37) S. Tomac, M. Sarkar, T. Ratilainen, P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Nordén, A. Gräslund, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5544 (1996)
 - 38) H. Knudsen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 494 (1996)
 - 39) B. P. Gangamani, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Tetrahedron*, **52**, 15017 (1996)
 - 40) B. P. Gangamani, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Tetrahedron*, **55**, 177 (1999)
 - 41) S. Jordan, C. Schwemler, K. Winfried, A. Kretschmer, E. Schwenner, U. Stropp, B. Mielke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 681 (1997)
 - 42) M. D'Costa, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Org. Lett.*, **1**, 1513 (1999)
 - 43) M. D'Costa, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Org. Lett.*, **3**, 1281 (2001)
 - 44) Y. Li, T. Jin, K. Liu, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **20**, 1705 (2001)
 - 45) P. Lagriffoule, P. Wittung, M. Eriksson, K. K. Jensen, B. Norden, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Chem. Eur. J.*, **3**, 912 (1997)
 - 46) S. C. Brown, S. A. Thomson, J. M. Veal, D. G. Davis, *Science*, **265**, 777 (1994)
 - 47) M. Leijon, A. Gräslund, P. E. Nielsen, O. Buchardt, B. Nordén, S. M. Kristensen, M. Eriksson, *Biochemistry*, **33**, 9820 (1994)
 - 48) L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, S. R. Jordan, *Science*, **270**, 1838 (1995)
 - 49) H. Rasmussen, J. S. Kastrup, J. N. Nielsen, J. M. Nielsen, P. E. Nielsen, *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 98 (1997)
 - 50) C. D. Roberts, R. Schüts, C. J. Leumann, *Synlett*, **1999**, 819
 - 51) R. Schütz, M. Cantin, C. Roberts, B. Greiner, E. Uhlmann, C. Leumann, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **39**, 1250 (2000)
 - 52) A. Püschl, T. Boesen, G. Zuccarello, O. Dahl, S. Pitsch, P. E. Nielsen, *J. Org. Chem.*, **66**, 707 (2001)
 - 53) A. Püschl, T. Tedeschi, P. E. Nielsen, *Org. Lett.*, **2**, 4161 (2000)
 - 54) M. Kuwahara, M. Arimitsu, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 256 (1999)
 - 55) M. Kuwahara, M. Arimitsu, M. Shigeyasu, N. Saeki, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 4653 (2001)
 - 56) D. A. Barawkar, Y. Kwok, T. W. Bruice, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5244 (2000)
 - 57) E. Uhlmann, *Biol. Chem.*, **379**, 1045 (1998)
 - 58) A.C. van Laan, P. Havenaar, R. S. Oosting, E. Kuyl-Yeheskiely, E. Uhlmann, J. H. v. Boom, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 663 (1998)
 - 59) L. Good, R. Sandberg, O. Larsson, P. E. Nielsen, C. Wahlestedt, *Microbiology*, **146**, 2665 (2000)
 - 60) M. Vaara, M. Porro, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 1801 (1996)
 - 61) L. Good, S. K. Awasthi, R. Dryselius, O. Larsson, P. E. Nielsen, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 360 (2001)
 - 62) M. Pooga, M. Hallbrink, M. Zorko, U. Langel, *FASEB J.*, **12**, 67 (1998)
 - 63) D. Derossi, S. Colvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.*, **271**, 18188 (1996)
 - 64) M. Pooga, U. Soomets, M. Hällbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaei, U. Kahl, J.-X. Hao, X.-J. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, T. Hökfelt, T. Bartfai, Ü. Langel, *Nat. Biotechnol.*, **16**, 857 (1998)
 - 65) T. Mayhood, N. Kaushik, P. K. Pandey, F. Kashanchi, L. Deng, V. N. Pandey, *Biochemistry*, **39**, 11532 (2000)
 - 66) N. Kaushik, A. Basu, P. Palumbo, R. L. Myers, V. N. Pandey, *J. Virol.*, **76**, 3881 (2002)
 - 67) C. W. Greider, E. H. Blackburn, *Nature*, **337**, 331 (1989)
 - 68) J. C. Norton, M. A. Piatyszek, W. E. Wright, J. W. Shay, D. R. Corey, *Nature Biotech.*, **14**, 615 (1996)
 - 69) S. E. Hamilton, C. G. Simmons, I. S. Kathiriyi, D. R. Corey, *Chem. Biol.*, **6**, 343 (1999)
 - 70) G. Cutrona, E. A. Carpaneto, M. Ulivi, S. Roncella, O. Landt, M. Ferrarini, L. C. Boffa, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 300 (2000)
 - 71) S. Tyagi, F. R. Krammer, *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303 (1996)
 - 72) B. Armitage, D. Ly, T. Koch, H. Frydenlund, H. Ørum, G. B. Schuster, *Biochemistry*, **37**, 9417 (1998)
 - 73) O. Steitz, O. Köhler, *Chem. Eur. J.*, **7**, 3911 (2001)
 - 74) H. Kuhn, V. V. Demidov, B. D. Gildea, M. J. Fiandaca, J. C. Coull, M. D. Frank-Kamenetskii, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, **11**, 265 (2001)
 - 75) H. Kuhn, V. V. Demidov, J. M. Coull, M. J. Fiandaca, B. D. Gildea, M. D. Frank-Kamenetskii, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1097 (2002)
 - 76) N. Winssinger, J. L. Harris, B. J. Backes, P. G. Schultz, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **40**, 3152 (2001)
 - 77) B. Liu, Y. Han, D. R. Corey, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1838 (2002)

PROFILE

岩瀬礼子 京都工芸繊維大学繊維学部・助手
 〔経歴〕1984年東京理科大学理学部化学科卒業、1989年東京工業大学大学院総合理工学研究科生命化学専攻博士課程修了(理学博士)、同年ヘキストジャパン(株)創業研究所研究員、1996年より現職。〔専門〕核酸化学。
 〔連絡先〕e-mail: [redacted]

村上章 京都工芸繊維大学繊維学部・教授
 〔経歴〕1973年京都大学工学部石油化学科卒業、1988年京都工芸繊維大学助教授、1993年京都工芸繊維大学教授〔専門〕核酸化学。
 〔連絡先〕[redacted]