HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヌクレアーゼ抵抗性化学修飾核酸の開発研究
Author(s)	松田, 彰
Citation	YAKUGAKU ZASSHI, 131(2), 285-298
Issue Date	2011
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/46999
Type	journal article
File Information	Yaku131(2).pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

—Review—

ヌクレアーゼ抵抗性化学修飾核酸の開発研究

松田 彰

Development of Highly Nuclease-resistant Chemically-modified Oligonucleotides

Akira MATSUDA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita-12, Nishi-6, Kita-ku, Sapporo 060–0812, Japan

(Received June 28, 2010)

Chemical modification of therapeutic oligodeoxyribonucleotides (ODNs) is necessary to avoid not only degradation by endo- and exo-nucleases but also recognition by sensors such as an innate immune system. We have been developing modified nucleosides having an aminoalky linker at the pyrimidine nucleobase or sugar moiety. ODNs containing 5-*N*-(6-aminohexyl) carbamoyl-2′-deoxyuridine (**7**) were thermally stabilized about 3°C per modification and were about 160 times more stable to hydrolysis by snake venom phosphodiesterase (a 3′-exonuclease) than unmodified ODNs, but not by endonucleases. On the other hand, ODNs containing 4′-*C*-(aminoethyl) thymidine (**14b**), which was synthesized by a newly developed radical cyclization-ring-enlargement reaction by us, were 87 times more stable to hydrolysis by DNase I (an endonuclease) and 133 times more stable in 50% human serum than unmodified ODNs. The highly stereoselective synthesis of 4′-thioribonuclesides (^{S}Ns) was also developed using a Pummerer reaction. Human thrombin RNA aptamer (CII-1-37) containing 4′-thiouridine and 4′-thiocytidine was obtained by SELEX with a K_d value of 4.7 nM, while a previously known RNA aptamer (RNA-24) has a K_d value of 85 nM. Studies of the modification pattern-RNAi activity relationships by using ^{S}Ns have been carried out against luciferase genes. We found that siRNAs, which have 4 residues of ^{S}Ns on both ends of the sense strand and 4 residues on the 3′-end of the antisense strand, were the most effective. 4′-ThioRNA is about 1100 times more stable in 50% human plasma than unmodified RNA. However, oligoribonucleotides (^{SM}ONs) containing 2′-*O*-methyl-4′-thioribonucleosides were 9800 times more stable in 50% human plasma than unmodified RNA. Since ^{SM}ON duplexes were thermally more stable than unmodified ON duplexes, therefore they would be quite suitable to use for oligonucleotide therapeutics.

Key words——nuclease; oligonucleotide; amino linker; radical cyclization; RNA interference; aptamer

1. はじめに

低分子創薬は徐々に困難になりつつあると言われて久しい．容易に創薬できる標的の枯渇が主要な原因と考えられている．それを補完すべく，従来比較的困難であった高分子創薬が注目されている．従来とは異なる標的に対する創薬が可能であるからであろうか．高分子創薬の主役として期待されているのは，タンパク質と核酸であるが，タンパク質による抗体医薬開発が一歩先んじ，核酸医薬開発は困難を極めているのが現状である．それは，1）われわれの細胞では，外来病原体である細菌やウイルスなどを非自己と認識する自然免疫が発達し，特に，それらの遺伝子であるDNAやRNAを感知するシステムがエンドソームのみならず細胞質内にかなり巧妙に張り巡らされているからである．投与した核酸医薬が非自己とみなされると抗菌・抗ウイルスの自然免疫が活性化され，狙った効果ではなく望ましくない効果（off-target効果）の発現につながり，場合によっては死に至る．一方，2）われわれの細胞中にある核酸が上記のシステムに捕まると自己免疫病になるので，不必要な核酸は十分に分解されねばならない.[1] これらを担う酵素が核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）である.[2] したがって，核酸医薬は自然免疫系に感知されず，しかも，ヌクレアーゼによる分解から逃れなければ十分な活性発現ができないことになる．さらに，リン酸アニオンの集合体である核酸は細胞膜透過し難いのでそれを克服するキャリ

北海道大学大学院薬学研究院（〒060–0812 札幌市北区北12条西6丁目）
e-mail: matuda@pharm.hokudai.ac.jp
本総説は，平成22年度日本薬学会賞の受賞を記念して記述したものである．

アが必要であるとともに，狙った細胞器官や臓器に送達する仕組みの開発も不可欠である．これらが車の両輪のごとくはたらくことにより核酸創薬が現実化する．

さて，核酸創薬につながる細胞機能調節法としては，まず，1970年代後半に生まれたアンチセンス法を挙げることができる．mRNAをセンス鎖とし，その配列に相補的なアンチセンス分子をWatson-Crick型の水素結合により2本鎖を形成させるとアンチセンス鎖がDNAの場合には，RNase HがmRNAを切断し翻訳阻害を引き起こす．[3] mRNAの高次構造を予測するのが現在の技術・知識でも簡単ではないので，どの配列を標的にすべきか（2本鎖部分は熱的に安定で標的になり難い）を決定するのがかなり大変であるが，原理的には単純である．同時期に2本鎖DNAに対して第3鎖をHoogsteen型水素結合で結合させ転写阻害を起こすアンチジーン法の原理も提案された．[4] リボザイムは，酵素活性を持つRNA（のちに，酵素活性を持つDNAも開発された）であり，mRNAを加水分解し翻訳阻害を起こす．[5] 1990年代前半には，核酸を用いる分子進化工学的手法が開発され，天文学的な数の配列混合物から標的と結合できる配列を持った分子を選択し，標的に対する結合の選択圧を徐々に上げるなどの工夫をして強固に結合できるアプタマーを得ることができるようになった．[6] 転写因子は標的DNAのプロモーター領域の結合配列を認識し結合することで遺伝子発現を開始するが，同じ結合配列を持つ短鎖おとりDNA 2本鎖（デコイDNA）を高濃度に共存させると，転写因子がデコイにトラップされるために転写阻害を起こす．[7] また，1990年代後半には2本鎖長鎖RNAが線虫の標的遺伝子をノックダウンするRNA干渉法が発見され，2000年初めに短鎖RNA 2本鎖（siRNA）が動物細胞にも使用可能であることが示された．[8] 標的遺伝子のノックダウン法としては，アンチセンス法よりも低濃度で効果を示すことから注目を集め，バイオベンチャー企業による臨床試験も始まっている．このような歴史の中で，アンチセンス医薬の臨床試験は数百行われたにもかかわらず，1998年に米国でエイズ患者のサイトメガロウイルス性網膜炎治療薬（Vitravene, 21 merホスホロチオエート型DNA）が眼内注射薬として認可されたのみである．2004年になり加齢性黄斑変性症に対する治療薬（失明予防）として初のアプタマー薬Macugenが眼内注射薬として認可された．

ところで，遺伝子本体であるDNA分解に関与するヌクレアーゼについては比較的古くから知られており，細胞内には各種エンドヌクレアーゼが豊富に存在し，特にアポトーシス時にこれらがはたらき複製単位で遺伝子を分解しゲル電気泳動でラダー状に観察されることが有名である．一方，血液中にはエキソヌクレアーゼ活性が高く，培養細胞を用いる実験では添加する血清中にこの活性が含まれている．RNAに対する分解酵素（エンドヌクレアーゼ）は，古くからRNase AやRNase T1などがRNA配列決定に重要な役割を果たしてきたが，細胞内外のRNA分解に実際に関与するRNaseについてはRNA干渉のメカニズムとの関連で現在それらの研究が精力的に行われている．RNAの加水分解は，酵素によって活性化された2′-水酸基がリン原子を攻撃することで反応が開始されるが，DNAには2′-水酸基が存在しないために酵素によって活性化された水がリン酸ジエステル基を直接切断するか，一度，酵素にリン酸基を転移してから活性化された水がそれを加水分解するメカニズムが提唱されている．[2] しかし，現実的にどの酵素が核酸分解に関与しているかが不明な時点で，提唱されているメカニズムから抵抗性を考えるのは難しいので合成したオリゴヌクレオチドの5′-末端を^{32}Pでラベルし，ヒト血清又は血漿中，及び，細胞抽出液中での安定性をゲル電気泳動法で調べるのが現実的である．

本稿では，ヌクレアーゼ抵抗性DNA分子（アンチセンス法）及び，ヌクレアーゼ抵抗性RNA分子（アプタマー，RNA干渉）の探索研究中に得られたわれわれのグループの知見を中心に述べる．

2. アミノアルキル側鎖を持つDNAオリゴマーの開発

プトレッシン，スペルミンやスペルミジンなどのポリアミンは核酸と結合しその構造を熱的に安定化することが古くから知られている．しかし，それらはポリカチオンとして核酸のリン酸アニオンを中和し，溶液のイオン強度を下げることでリン酸アニオン同士の反発を低下させることによるが，結合様式は明らかになっていない．ポリアミンが結合した核酸のX線結晶解析を行ってもポリアミンの結合位

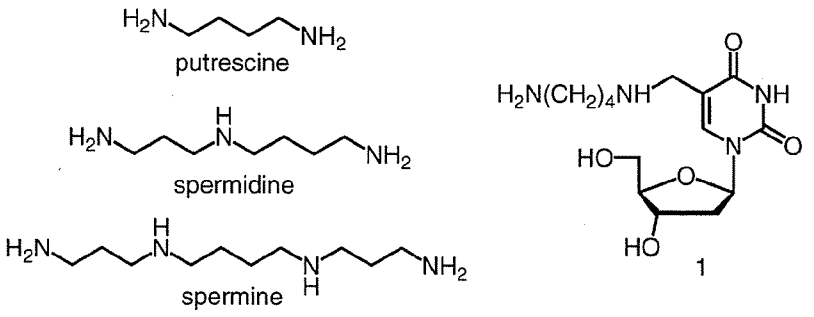


Fig. 1. Structures of Polyamines and α-Putrescinylthymidine

置が不明確である．一方，バクテリオファージ φW-14 の DNA 中のチミジンの約 50% が α-プトレッシニルチミジン（**1**, Fig. 1）に置換されており，熱的安定性を向上させるとともにヌクレアーゼに対して抵抗性を示すことが知られている.[9] そこで，オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）にアミノアルキル側鎖を導入すれば，ヌクレアーゼと正常な位置での結合を阻害することで抵抗性を示すとともに，末端アンモニウム基によるリン酸アニオンの中和効果により 2 本鎖 ODN の熱的安定性を高めるのではないかとの仮説をたて，1）ヌクレオシドと末端アミン間の距離，及び，2）ヌクレオシド上のアミノアルキル側鎖の結合位置を変えた ODN を網羅的に合成し，それらの熱的安定性とヌクレアーゼ抵抗性を解析した.[10]

2-1. ピリミジン 5 位へアミノアルキル側鎖を導入したオリゴヌクレオチドの合成と性質　種々のアミノアルキル側鎖をウラシル 5 位に結合させるときに，それらを持つ ODN を 1 本ずつ個別に合成するのは非効率的である．そこで，その煩雑さを解消する新手法を開発した（Fig. 2）.[11,12] まず，ODN 合成中には化学的に安定であるが，最終的に目的とするアミノアルキル基を導入できるヌクレオシドユニットとして **3** を考案した．オリゴヌクレオチド固相合成では最終段階で，樹脂からの脱着と同時に核酸塩基部及びリン酸部の保護基の除去を濃アンモニア水で行っているので，その代わりにアルキルジアミンで処理すると上記の反応に加えて，エステルからアミドへの変換が一挙に可能になるはずである．さらに，固相上に ODN を結合した **5** のまま，それらを長さの異なるアルキルアミンの種類に応じて分割し個別にアルキルアミンと反応させれば目的とする ODN **6** を一挙に別々に合成することが可能になるはずである（Fig. 2）．また，分割せずに数種類ずつの長さの異なるアルキルジアミンと反応させるとと combinatorial chemistry 的な展開も可能になる．そこで **3** を 5-ヨード-2′-デオキシウリジン誘導体（**2**）から Pd 触媒を用いる CO 挿入反応で合成し，ODN 中の望みの位置に 1–5 個導入し ODN **5** を得，それぞれにエチレンジアミン又はヘキサンジアミンを反応させ，対応する ODNs（**6a, b**）を合成した．合成した ODNs 2 本鎖の熱的安定性を調べたところ，エチレンジアミンを含む ODN は 1 残基導入あたり約 2°C の，また，ヘキサンジアミンを含む ODN は 1 残基導入あたり約 3°C の 50% 融解温度（T_m）を上昇させた．末端アミノ基をアセチル化すると熱的安定性は全く得られなくなるので，ODN 2 本鎖の熱的安定性は，末端アンモニウムがいかに効率的にリン酸アニオンを中和できるかにかかっていることが明らかになった．また，**7**（Fig. 3）を 1 個含む自己相補的な 12 mer ODN 2 本鎖の X 線結晶解析を行ったところ，5 位カルバモイル基 NH と 4 位カルボニル基間で 6 員環の水素結合を形成し末端アミノアルキル基の方向を規定しているとともに，末端アンモニウムがリン酸アニオンと静電的な相互作用をしている結晶像を見い出した.[13] **7** を含む ODNs のヌクレアーゼに対する安定性を調べたところ，3′末端に含む場合は，3′-エキソヌクレアーゼやそれを豊富に含む子牛血清中では極めて安定（未修飾 ODN の半減期は 13 分であるのに対して 48 時間以上）であったが，**7** を鎖内に複数個含む場合でもエンドヌクレアーゼに対しての抵抗性はほとんど向上しなかった.[14] 一方，リボヌクレオシドの 2′-水酸基をメチル化した 2′-OMe 体を含む ODN はエンドヌクレアーゼ抵抗性を示すことが知られている．そこで，**7** の 2′-OMe 体 **8** を合成し，

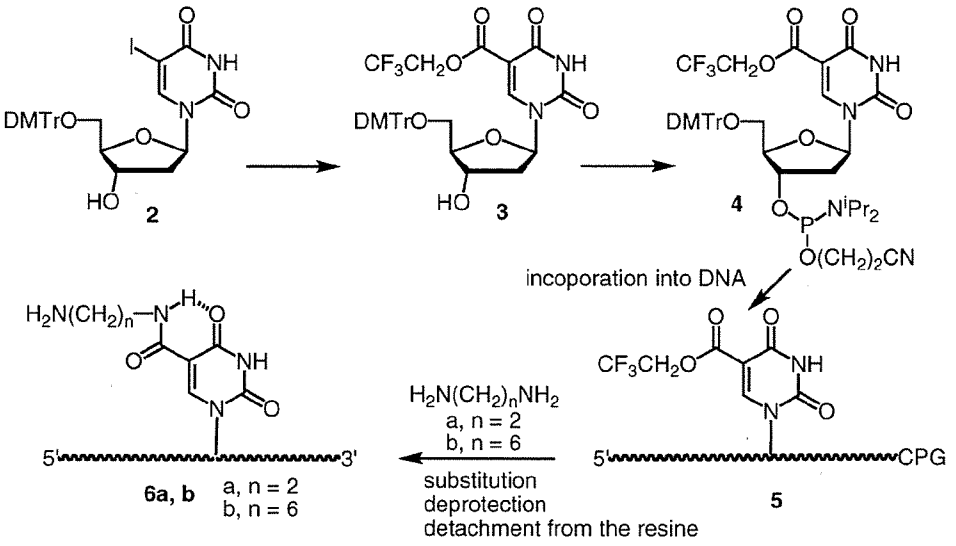


Fig. 2. An Outline of the Post-synthetic Modification Method

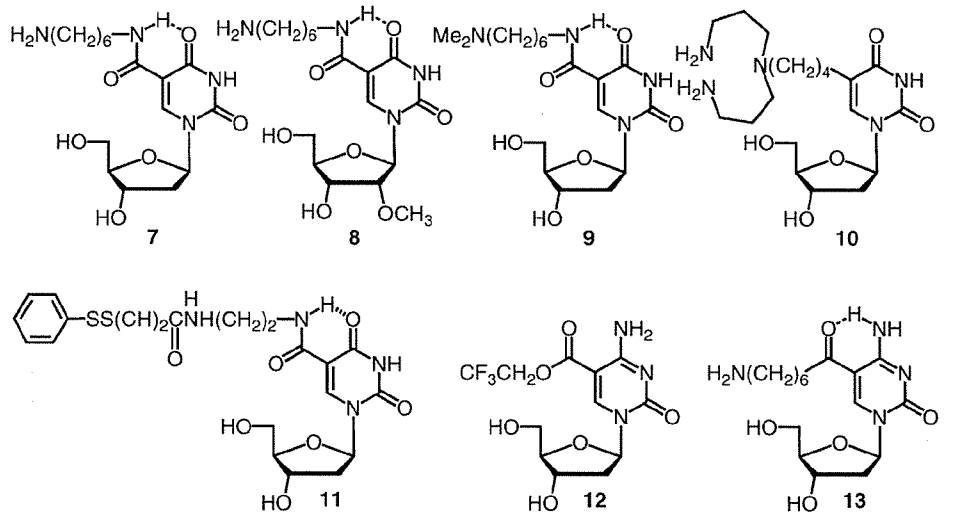


Fig. 3. Sutructures of Various 5-Substituted Pyrimidine Nucleosides

それを含むODNsのエンドヌクレアーゼに対する抵抗性を調べたが，その効果は期待したほどではなかった.[15]

しかし，ウラシル5位にカルボニル基を介するアミノアルキル側鎖の導入はODN 2本鎖の熱的安定性を獲得する方法としては優れている．そこで，熱的安定性を得るための末端ジメチルアミノ体**9**と**7**を同一鎖内に共存させたODNを合成してから，葉酸，脂肪酸やコレステロール等の膜透過性基を**7**の末端アミノ基に反応させる方法も開発した（Fig. 3）.[16] さらに，**7**[17,18] や**10**[19] を含むODNsはDNA 3本鎖を安定化することも見い出した．また，**11**を5′-末端に含むODNを酸素酸化して得られる2量体は比較的短鎖のオリゴプリン配列を交互に持つ2本鎖ODNに対して熱的に安定な3本鎖を形成した.[20,21] 一方，シトシン5位にカルバモイル基を介してアミノアルキル基を結合させるとアミノアルキル基の方向が変わると考えられた．そこで，5-ヨード-2′-デオキシシチジンから合成した**12**を1個含むODNを合成し，先と同様にエチレンジアミンとヘキサンジアミンを反応させてそれぞれ対応するODNsを得た．これらを含む2本鎖ODNsの熱的

安定性を調べたところ，エチレンジアミンを含むODNはむしろ安定性を下げたが，ヘキサンジアミンを反応させて得た**13**含むODNは**7**を1個含むODNよりも高い熱的安定性を示した.[22] しかし，**12**の場合は，トリフルオロエチル基の脱離能が低く，複数個をODNsに導入した場合に純粋なジアミン置換ODNsを得ることが可能ではなかったので，さらに反応性の高い誘導体の工夫が必要である.

2-2. 糖部4′位へアミノアルキル側鎖を導入したオリゴヌクレオチドの合成と性質　当時，ODNsの3′-エキソヌクレアーゼに対する抵抗性獲得法は既にいくつか知られていた．しかし，細胞内に取り込まれた後では，エンドヌクレアーゼ抵抗性が重要である.

典型的なエンドヌクレアーゼである制限酵素とDNA 2本鎖との共結晶像が報告されている．多くの場合，酸性アミノ酸や塩基性アミノ酸側鎖がODNのマイナーグルーブ側に存在していることから，糖部4′-位へのアミノアルキル基の導入により，末端アンモニウムと電荷を持ったアミノ酸残基との静電的な相互作用で正常な位置での結合が阻害される結果エンドヌクレアーゼによる加水分解から逃れられるのではないかとの仮説をたてた．そこで，チミジン4′位にアミノメチル基，アミノエチル基，及び，アミノプロピル基を導入することにした（Fig. 4）．4′-アミノメチルチミジン**14a**[23]は既知化合物であり3′-エキソヌクレアーゼに対するある程度の抵抗性を示すことが定性的に報告されていたが他の化合物**14b, 14c**については新規（合成法については後述）であり定量的な検討を行うことにした.[24-26] 先のウラシル5位置換体の場合のように**14a–c**を導入位置及び導入個数を変えて数種類合成し，まず，ODN 2本鎖の熱的安定性を調べた．アミノメチル体**14a**の導入は1個あたり0.9℃のT_m値の上昇を，アミノエチル体**14b**の場合は1.1℃，アミノプロピル体**14c**の場合は0.8℃上昇させた．しかし，一方の鎖をRNAにした場合は1個あたり0.10–0.15℃低下させたが，ODN鎖長が18 merの場合でT_m値が70℃以上あり，この程度のT_m値の低下はアンチセンス法に適用しても問題はないと考えられた．そこで次に，5′末端を^{32}PでラベルしたODNsを調製し，エンドヌクレアーゼ及びヒト血清中での安定性を調べた．エンドヌクレアーゼとして牛膵臓由来のDNase Iを用いたところ，未修飾のODN 1本鎖の半減期が20分であるのに対して，3′末端を含み**14a**を5個導入したODNのそれは27.0時間，同じ導入様式で**14b**及び**14c**を導入したODNsの半減期はそれぞれ28.9時間と27.7時間であった．一方，同じODNsを用いて50%ヒト血清（非加熱）中での半減期を調べたところ，未修飾体は27分であるのに対して，**14a–c**を含むODNsのそれは，1.7日，2.5日，7.3日と極めて安定であった.[26] この当時，アンチセンス法に応用可能なODNの開発では，もっぱら3′-エキソヌクレアーゼ抵抗性獲得に主眼がおかれていたので，エンドヌクレアーゼに強力に抵抗性を示す化学修飾は稀であっ

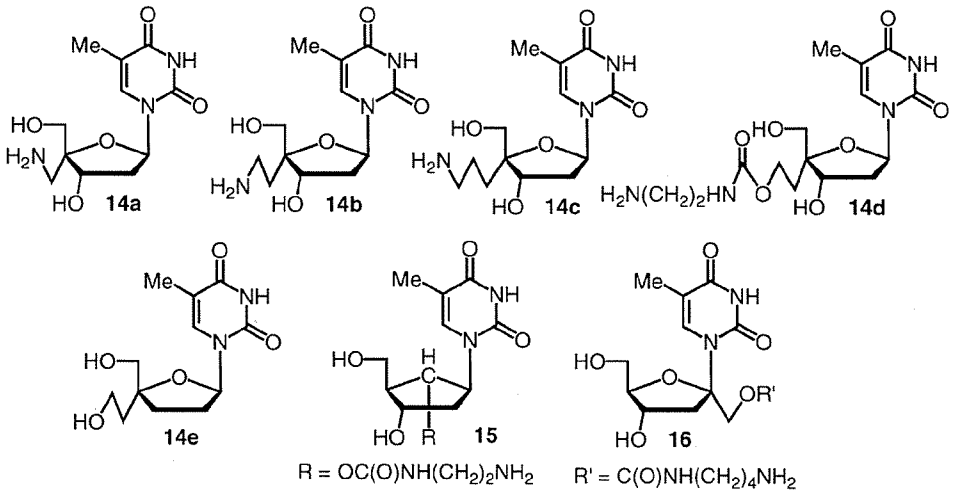


Fig. 4. Sutructures of Sugar-modified Nucleosides Having Aminoalkyl Linkers

た．なお，**14b** を含む ODN はマラリア原虫コハク酸脱水素酵素の mRNA を標的にするアンチセンス法で効果を示した．[27,28] 一方，**14b, 14c** を含む ODNs は熱的に安定な DNA 3 本鎖を形成するのに対して，**14a** や **14d** を含む ODNs は熱的に安定な 3 本鎖を形成しなかった．[29] また，ヘアピン ODN のヘアピン部に **14e** を導入すると安定なヘアピン構造をとることも明らかになった．[30]

その他，マイナーグルーブ側に位置する炭素環チミジン 5′位（**15**）[31] やヌクレオシド 1′位（**16**）[32,33] にアミノアルキル基を導入した化合物を含む ODNs を合成し，それらの性質を調べたが十分なヌクレアーゼ抵抗性や熱的安定性を示さなかった．

アミノアルキル側鎖を持つ ODN 2 本鎖の熱的安定性とエキソ及びエンドヌクレアーゼに対する抵抗性を Table 1 にまとめた．[10,34] ヌクレオシド部分のアミノアルキル側鎖導入位置によって ODN の熱的安定性やヌクレアーゼ抵抗性が異なることが明らかになった．熱的安定性は末端アンモニウム基のリン酸アニオンの中和効果によると考えられるが，ヌクレアーゼ抵抗性の獲得は，予想したように導入した末端アンモニウム基により，正常な位置でのヌクレアーゼとの結合を阻害しているのかどうかについてはさらなる検討が必要である．

2-3. 新規ラジカル環化–環拡大反応の発見と展開　従来，ヌクレオシド C4′位へ二炭素を一気に導入する方法は知られていなかった．上述した **14b** の合成過程で新規なラジカル環化–環拡大反応を発見した．[35,36] その反応の概略を Fig. 5 に示す．炭素–ケイ素結合は炭素–酸素結合より長く，また，ケイ素上の置換基の立体障害で Baldwin-Beckwith 則から逸脱した 6-endo 環化が進行するのではないかとの仮説をたて，まず，モデル化合物として市販の 2-ブロモインダノールをビニルシリル体（**17**）へ誘導しベンゼン中 Bu_3SnH との反応を検討した [Fig. 5 (A)]．[37] 環化成績体を玉尾酸化し開環したところ，**18** と **19** が生成した．予想した **19** の生成が観察され，6-endo 環化が進行したようにみえた．そこで，D 化実験等により反応機構を調べた．ラジカル中間体（**20**）が経路 b で 6-endo 環化すれば D 体 **23** を与えるが，経路 a で 5-exo 環化する場合は D 体 **21** を与えるはずである．そこで，Bu_3SnD を用いたラジカル反応を行い，先と同様に玉尾酸化したところ D 体 **24** と **25** が得られた．D 体 **25** は **22** の玉尾酸化で得られるはずであるので，単純な 6-endo 環化反応は進行していないことが推察された．Figure 5 (B) に示すように中間に生成するラジカル **26** から経路 c で遷移状態 **27** を通り，さらに環拡大反応で **28** が生成する場合と，**26** が一度開環（経路 d）し，生成するシリルラジカルが 6-endo 環化（シリルラジカルの 6-endo 環化反応は知られている）して **28** が生成する 2 通りが考えられた．そこで，どちらの経路で反応が進行するかを調べるための基質として D 体 **31** をデザインした [Fig. 5 (C)]．**31** から生成する 5-exo 環化体（**33**）は，経路 c を通る場合は **34** を経て **35** に環拡大した後に Bu_3SnH と反応し環内に D を含まない **36** のみを生成する．一方，経路 d で反応が進行する場合は，シリルラジカル **37** が両方の二重結合と反応できる（二重結合に対するラジカル付加のアイソトープ効果は $k_D/k_H=1.12$ である）ために最終産物としては **36** と **39** の混合物を与えるはずである．そこで，**31** をラジカル環化反応に付し，玉尾酸化の後，生成物の単離精製を容易にするために水酸基をベンゾイル化して構造を調べたところ，**39** の生成は全く認められず **36** のみが得られた．したがって，本ラジカル環化反応は，いったん生成した 5-exo 環化体（**33**）がシラシクロプロピルラジカル（**34**）から環拡大反応を起こす新規なラジカル環化–環拡大反応であることが明らかになった．本反応の際に Bu_3SnH 濃度が高い場合（0.01 M）は，中間体 **26** がもっぱら還元され，玉尾酸化後に 1-エタノール体（**18**）を選択的に合成できるが，比較的低濃度（0.002 M）の Bu_3SnH を用い，高温条件では玉尾酸

Table 1. Thermal Stability and Nuclease-resistance Properties of the ODNs Containing the Nucleoside Analogues with the Amino Linkers

modified nucleosides in ODNs	7	8	14b	15	16
Thermal Stability					
DNA-DNA	+++	ND	+	+	−
DNA-RNA	+	+++	−	−−	−−−
Nuclease Resistance					
3′-exonuclease	+++	+++	++++	+	+
endonuclease	±	++	++++	+	+

+: high, −: low, ND: not determined.

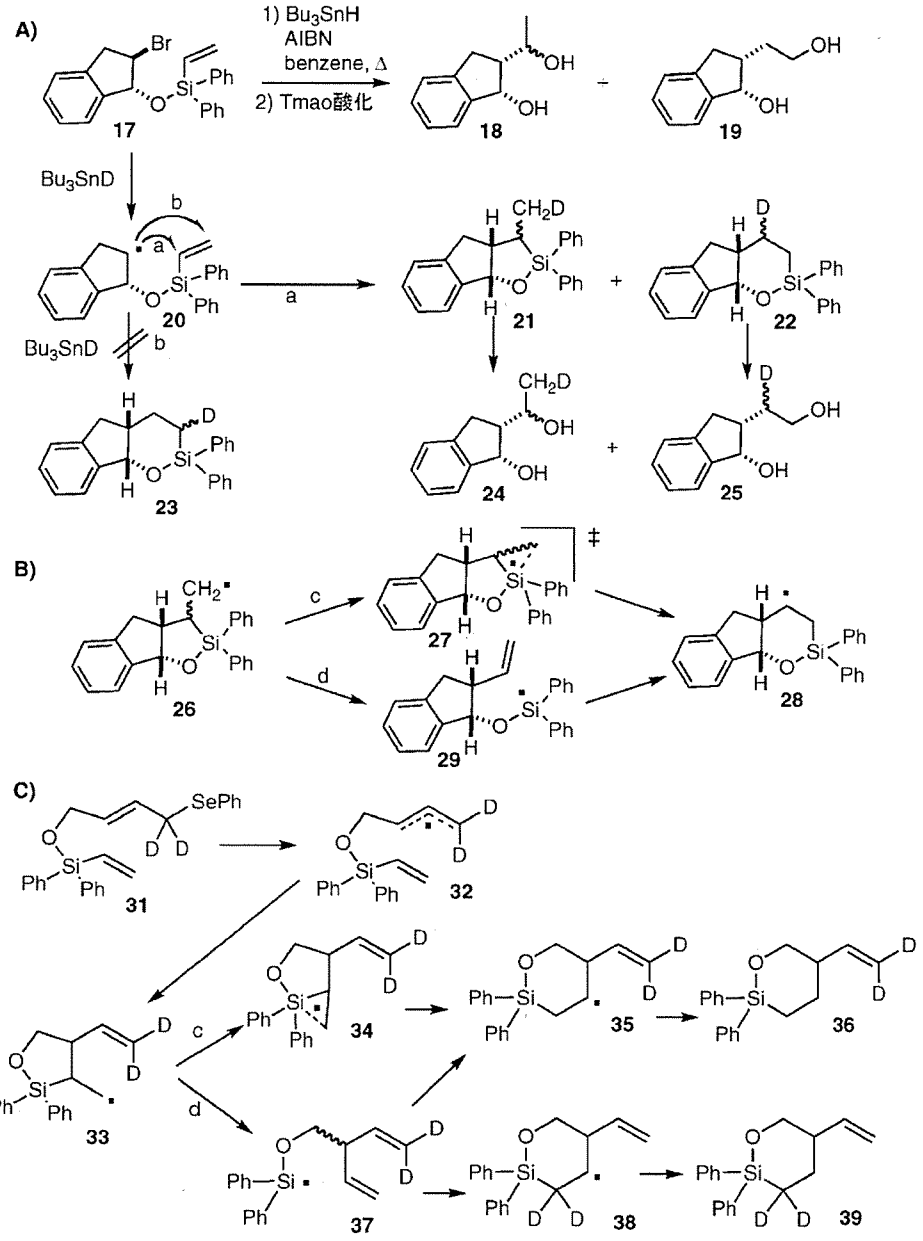


Fig. 5. Development of a New Radical Cyclization-ring-enlargement Reaction

化後に2-エタノール体（**19**）を選択的に与えることが分かった.[38,39]

上記の反応をチミジン（**40**）から9工程で誘導したビニルシリル体（**46**）に適用したところ，先のモデル実験の結果を忠実に反映し4′-*C*-(1-エタノール）体（**47**），及び4′-*C*-(2-エタノール）体（**48**）を高収率で作り分けることができた（Fig. 6）．化合物**48**の一級水酸基をアミノ基に変換し，さらに，ホスホロアミダイト体（**49**）に変換して前節で述べたオリゴヌクレオチドに導入した．一方，4′-アミノプロピル体は，先の中間体（**45**）の3′-水酸基をアリルシリル化し**50**に変換後，ラジカル環化反応に付し，玉尾酸化したところ**52**が高収率得られたことから7-endo環化体（**51**）を経由して得られたと考えられる．化合物**52**は同様にアミダイト体（**53**）に誘導後DNA合成に使用した．

さて，以上述べたラジカル環化–環拡大反応は，ビニルシリル基を水酸基の隣の炭素にアルコール体として移動させた反応であった．もし，同じ酸化状態のまま（ビニル体として）隣に移動できれば新た

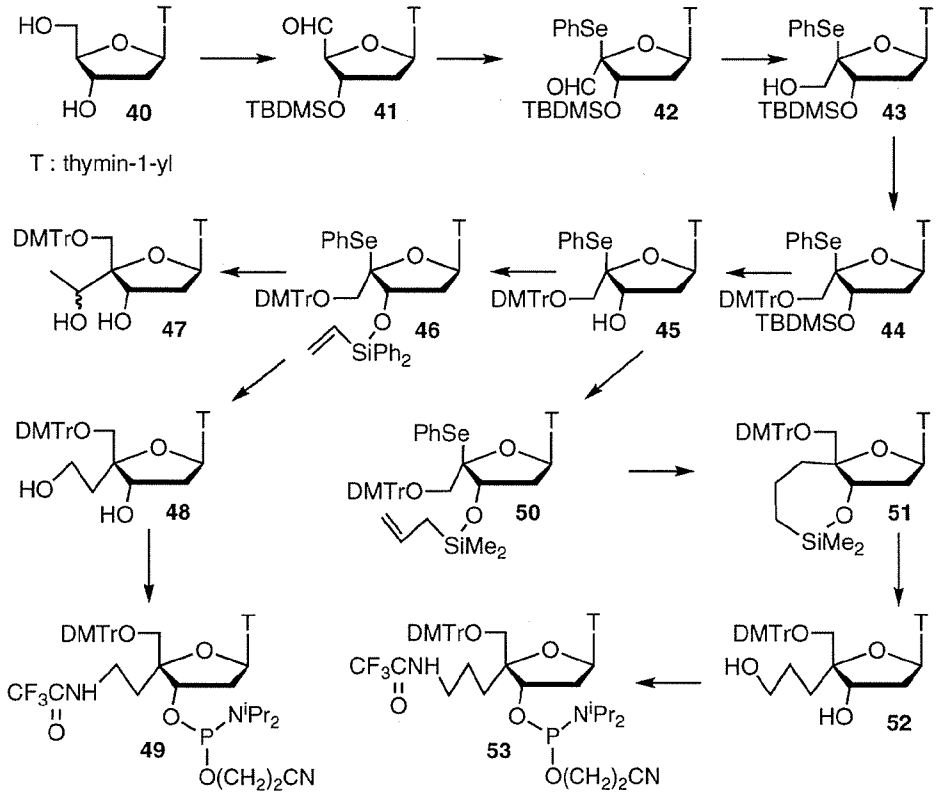


Fig. 6. Synthesis of 4′-*C*-branched Thymidines *via* Radical Reactions

な官能基変換が可能である．そこで，**54** のラジカル環化反応を，中間に生成するラジカルを還元しないように光照射下 $(Bu_3Sn)_2$ で反応を行い，そのラジカル中間体が別分子のヨード基を引き抜きヨードメチル体（**55**）を生成させ（ラジカルアトムトランスファー反応），続いてフッ素イオン処理すると予想したビニル体（**56**）が得られた（Fig. 7）．[40] 本反応を使用してビニル基を糖部に持つヌクレオシド **57**,[40] **58**,[41] **59**[42] を合成することができた．同様の発想から，エチニルシリル体（**60**）に対してラジカル開始剤として Et_3B を用いた場合に収率よくエチニル基を隣接位に転移させた **62** に変換することも可能であった．[43–45] われわれは，既に 4′-エチニル体（**63**）を 4′-ヒドロキシエチル体から合成し，抗 HIV 活性[46] を示すことを報告していたが，本法の開発によりその合成が比較的容易になった．また，**64** も容易に合成することが可能であった．以上のように，本ラジカル環化反応は，水酸基をビニル又はエチニルシリルエーテル体に誘導し，隣接位に水酸基とシス配置で炭素置換基を種々の酸化状態で導入可能である優れた方法である．本法を使用した *C*-グリコシドの立体選択的合成法[47–53] も開発したが誌面の都合上割愛する．

3. 4′-チオ核酸の化学的及び酵素合成法の開発と医薬化学的展開

RNA 干渉の発見は驚きであり，アンチセンス法の創薬展開に行き詰まっていた核酸医薬化学研究に大きなインパクトを与えた．そこで，われわれは，修飾核酸の化学合成のみならず酵素合成も視野に入れ，天然型 RNA と構造的に大きく異ならない 4′-チオ RNA（^{S}RNA）に着目した．[54] 原料となる 4′-チオリボヌクレオシドは古くから知られる化合物であり，核酸塩基と対応するチオ糖との縮合により合成される．しかし，従来法は，縮合の立体選択性のみならず収率も満足できるものではなかった．

一般に糖と核酸塩基を縮合する場合は，糖部 2 位アシル基による隣接基関与を利用して β 体を選択的に合成する．しかし，チオ糖の反応中間体では 1 位の $\delta+$ 性が小さく，電子供与性の大きな隣接関与基の必要性が計算化学から示唆された．[55] そこで，D-リボース（**65**）から合成したチオ糖[56] の 2 位水酸基を 2,4-ジメトキシベンゾイル体（**66**）に誘導して

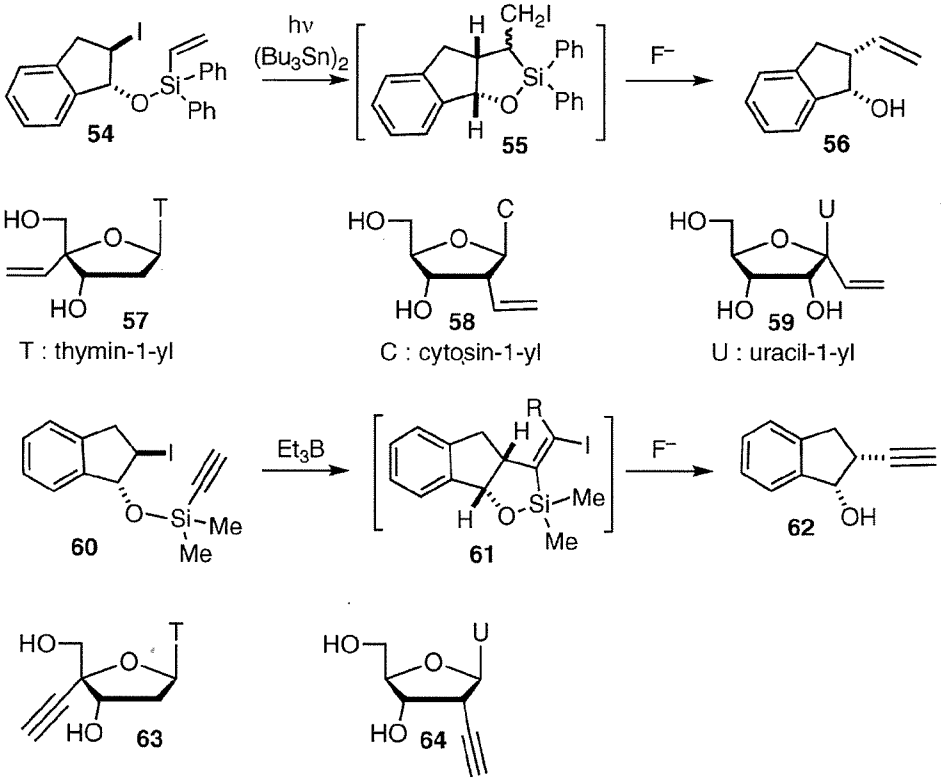


Fig. 7. Development of New Radical Reactions through an Atom Transfer Reaction

ルイス酸として TMSOTf 存在下に Pummerer 反応を行ったところ上記の問題点を一気に解決し，4 種類の 4′-チオリボヌクレオシド（**67**）の立体選択的合成を初めて達成できた（Fig. 8）.[57]

化合物 **67** を脱保護して得られる **68** を出発原料にして，^{S}RNA 化学合成のためのホスホロアミダイト体（**69**）,[58] 酵素合成のための 5′-三リン酸体（**70**, ^{S}NTP）,[59] 2′-*O*-メチル-^{S}RNA（^{SM}RNA）を合成するための **71**，及びそのホスホロアミダイト体（**72**）[60]を合成した．さらに，4′-チオ DNA（^{S}DNA）を合成するために **68** を対応する 2′-デオキシ体（**73**）[61]に誘導後，そのホスホロアミダイト体（**74**）[62]及び 5′-三リン酸体（**75**, d^{S}NTP）[63]に変換した．

3-1. 4′-チオ核酸の化学合成と性質　先に合成したホスホロアミダイト体（**69**, **72**, **74**）を用いて ^{S}RNA, ^{SM}RNA 及び ^{S}DNA を固相合成し，未修飾 RNA 及び DNA と物理化学的性質及びヌクレアーゼ抵抗性を比較した．同じ配列を持つ 15 mer 2 本鎖の熱的安定性を T_m 値（pH 7.0, 100 mM NaCl）で比較すると，^{S}RNA：^{S}RNA≒^{SM}RNA：^{SM}RNA＞^{S}RNA：RNA＞RNA：RNA＞^{S}DNA：^{S}DNA＞DNA：DNA＞^{S}DNA：DNA となった．[60] CD スペクトルから ^{S}RNA 及び ^{SM}RNA 2 本鎖は未修飾 RNA とほぼ同じ A 型構造をとっていると考えられた．一方，NMR による構造解析[64]の結果，及びグルーブバインダーとの結合実験[62]から，^{S}DNA 2 本鎖は未修飾 DNA がとる B 型ではなく A 型に近い構造であった．

一方，50% ヒト血漿中で未修飾 1 本鎖 RNA（15 mer）が 10 秒以下で完全に加水分解を受ける条件下で，1 本鎖 ^{S}RNA の半減期は 3.1 時間（1100 倍以上安定）であった．さらに，1 本鎖 ^{SM}RNA のそれは 27.2 時間（9800 倍以上安定）と極めて安定であった．[60] 一般に，2′-*O*-メチルリボヌクレオシドを含む ^{M}RNA はヌクレアーゼに対して安定であると考えられているが，配列・鎖長を同じくしてその安定性を比較したところ半減期は 7.5 時間であった．したがって，^{M}RNA は未修飾の RNA よりは 2700 倍以上安定であるが，^{SM}RNA は ^{M}RNA よりもさらに 3.6 倍安定であることが明らかになった．[60] 1 本鎖 ^{S}DNA もエンドヌクレアーゼに対して未修飾

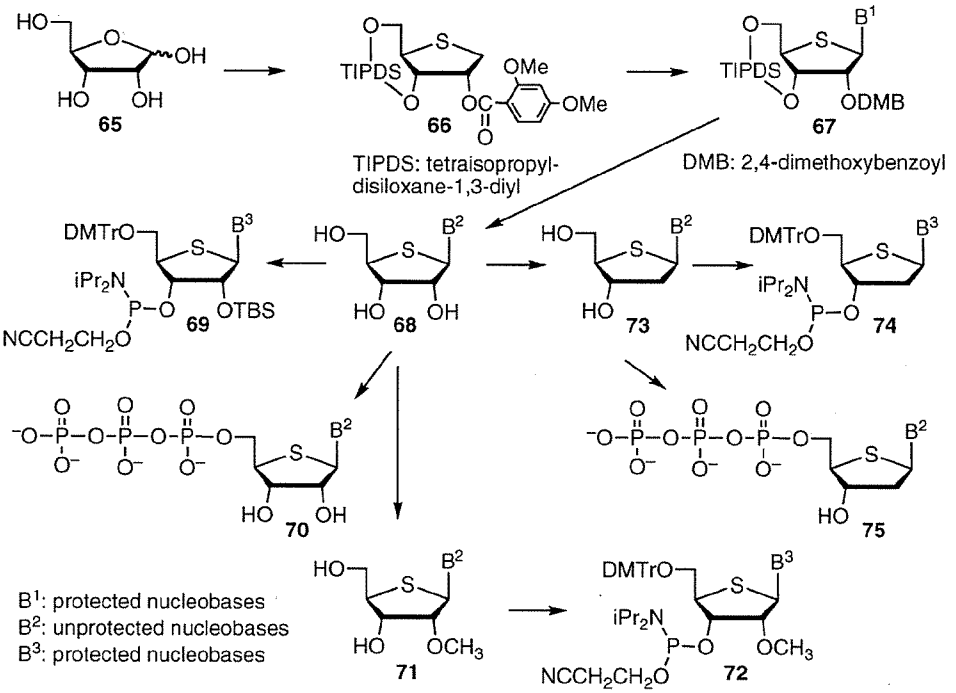


Fig. 8. Synthesis of Various 4′-Thionucleosides and Nucleotides

DNA よりも 480 倍安定であった.[62]

天然の核酸と 4′-チオ核酸の構造上の違いは，構成する糖部環内酸素原子が硫黄原子に置換されているだけであるにもかかわらず，なぜこのようにヌクレアーゼ抵抗性を示すのかは極めて興味深い．特に，4′-チオリボヌクレオシドは，リボヌクレオシドと同様に 2′位に水酸基を持つにもかかわらずかなり安定である．一般に，リボヌクレオシド C4′–O4′–C1′のなす二面対角は 110°であり，C1′–O4′間及び C4′–O4′間の距離は約 1.4 Å であるが，4′-チオリボヌクレオシドでは，C4′–S4′–C1′のなす二面対角は 95°であり，C1′–S4′間及び C4′–S4′間の距離は約 1.8 Å である．RNA の加水分解には RNase が対応する．2′-水酸基の近傍にヒスチジンのイミダゾール基などが存在し，2′-水酸基を活性化してリン原子を攻撃させる．したがって，上述した構造上のわずかな違いで水酸基の位置が異なり，近傍のアミノ酸側鎖との距離やリン原子への反応し易さが異なってくると推察される．2′-水酸基がメチル化された場合は，RNase では加水分解できないために DNA を加水分解するエンドヌクレアーゼが対応する．しかし，^{SM}RNA も ^{S}DNA も DNA に一般的な B 型構造ではなく，RNA に一般的な A 型構造をとるので活性化された水分子の攻撃が起こり難く，酵素–リン酸エステル結合も形成され難いと考えるとヌクレアーゼ抵抗性がよく説明できる．

3-2. 4′-チオ核酸の酵素合成とヌクレアーゼ抵抗性アプタマー及び shRNA 発現 DNA デバイスへの応用　アプタマーは核酸の分子進化工学的考え方に基づいて（SELEX 法）獲得される分子認識剤であり「核酸抗体」とも呼ばれることがある．抗体医薬は高価であり，その生産性も高くない．もし，抗体が持つ抗原に対する中和能だけが要求されるのであれば（現在まで，抗体が持つ抗体依存性細胞障害活性や補体依存性細胞障害活性を持つアプタマーは知られていない），標的（抗原）に対して結合するアプタマーは比較的低分子量であり，ヌクレオチド配列さえ分かれば合成器により何度も再生産が可能であり，安価に供給もできるので抗体の代わりになり得る．

現在までに加齢性黄斑変性症治療薬として VEGF に結合する Macugen が既に臨床使用されているが，構成するヌクレオチドは 2′-OMe 体及び 2′-F 体に置換されておりある程度のヌクレアーゼ抵抗性が獲得されている．この場合，最初に未修飾 RNA アプタマーを得てから，修飾ヌクレオチドの

導入位置を探したので最終形にたどり着くまでに長期の研究期間を要した．しかし，最初から修飾ヌクレオチドからなるアプタマーを獲得するには，化学修飾したヌクレオシド5′-三リン酸（(d)NTPs）がDNA又はRNAポリメラーゼのよい基質になり配列が確認できる量が得られるほど増幅されねばならない．T7 RNAポリメラーゼを使用する場合は，最初の十数ヌクレオチドの縮合段階（イニシエーションフェーズ）が重要でありここに非天然の修飾ヌクレオチドが取り込まれると酵素反応が止まることが多く，次の安定した鎖伸張が起こる段階（エロンゲーションフェーズ）に移行しない．4種類の^{S}NTPsを用いるとイニシエーションフェーズで酵素反応が止まるために，ピリミジンヌクレオチドだけを4′-チオ体（^{S}UTP, ^{S}CTP）にしたところ，これらはT7 RNAポリメラーゼのよい基質となり59 merの^{S}RNAが収率よく得られた．[59] また，この^{S}RNAは対応するDNAに忠実に逆転写された．したがって，まず，30 merのランダム配列を含む1本鎖DNAを化学合成しPCRで2本鎖DNAを得た．それをテンプレートにしてT7 RNAポリメラーゼにより^{S}UTP, ^{S}CTP及び未修飾ATP, GTPを用いてランダム配列を含む1本鎖^{S}RNAに転写し^{S}RNAプールを構築した．その中から，ヒトトロンビンに対して結合する^{S}RNAを選択し，これを逆転写酵素でDNA 1本鎖に変換した．以上の操作を1サイクルとしてヒトトロンビンに結合能を持つ^{S}RNAへと濃縮されるまで繰り返し行った．得られたアプタマーをクローニングして，その中から3本を選択しそれらをDNA/RNA合成機で合成してヒトトロンビンに対するK_d値を測定し，既知のDNA及びRNAアプタマーと比較した．アプタマーCII-1-37のヒトトロンビンに対するK_d値は4.7 nMであり，既知のRNA-24（K_d=85 nM）よりも高結合性であった（Fig. 9）．なお，CII-1-37は未修飾型より50倍酵素分解に抵抗した．[59] 一方，4種類の^{S}NTPsに未修飾のATP及びGTPを加えるとT7 RNAポリメラーゼで長鎖の高度に4′-チオヌクレオチドに置換した^{S}RNAが合成できることを見い出した．この方法を使ってすべて4′-チオヌクレオチドに置換した^{S}RNAヒトトロンビンアプタマーを取得することもできた．[65]

一方，d^{S}CTP, d^{S}TTPはKOD dash DNAポリメラーゼで比較的効率よく取り込まれた（種々のDNAポリメラーゼを検討したが4種類のd^{S}NTPを効率よく取り込む系を見つけるまでには至っていない）．本法で作製した^{S}DNAを含むshRNA発現デバイス（ルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制をするshRNAを発現する配列を含む）をNIH3T3細胞にトランスフェクションしRNAi効果を調べたところ，天然型DNAからなるプラスミドをトランスフェクションした場合よりも高活性であり，本法は新規なRNAi創薬の方法論になる可能性がある．[63]

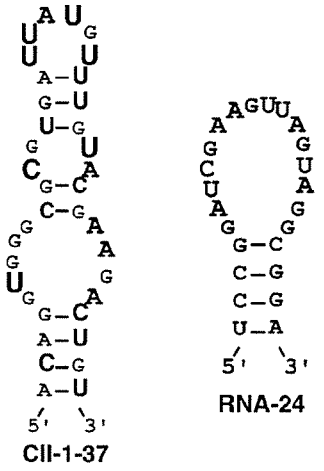


Fig. 9. Posturated Secondary Structures of Human Thrombin Aptamer (Bold in CII-1-37; 4′-Thioribonucleoside)

3-3. 4′-チオsiRNA誘導体のRNAi活性　RNA干渉法（RNAi）は前述したアンチセンス法よりも数倍–数十倍の活性で遺伝子ノックダウンが可能であることからバイオツールとしてのみではなく核酸創薬の大きな柱の1つとして世界的に注目を集めている．最初に述べたように，siRNAの化学修飾は，1）縦横無尽に張り巡らされた非自己感知網から逃れるために，また，2）ヌクレアーゼ抵抗性で効果の持続時間を延長するために必要である．前述のように^{S}RNAは未修飾RNAより格段安定であったので，まず，2種類のルシフェラーゼ遺伝子を標的にするsiRNAを合成し，4′-チオリボヌクレオシドの修飾位置–RNAi活性相関を調べた（Fig. 10）．その結果，もともと未修飾siRNAが高活性な配列の場合は，それよりもさらに活性を上げることは難しかったが，未修飾siRNAが低活性であったsiRNA3の場合には，修飾siRNA4で約2倍に活性増強が可能であった．[66,67] また，ヌクレアーゼ抵抗性がさら

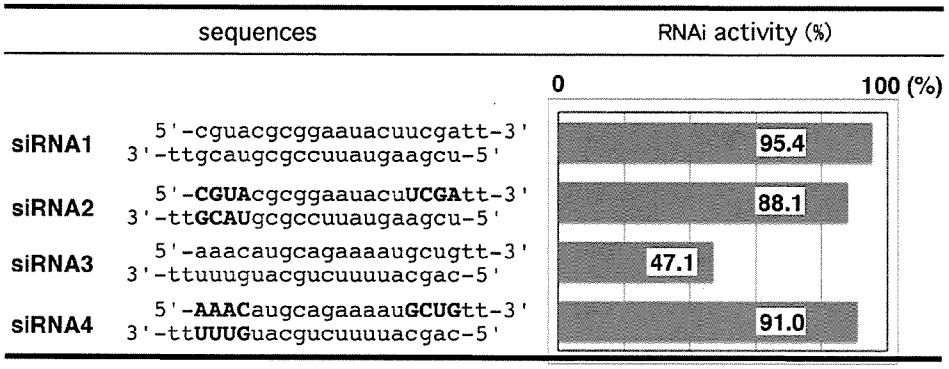


Fig. 10. Sequence and RNAi Activity of siRNA That Was Modified with 4′-thioribonucleosides (bold) Directed against *Photinous* Luciferase (siRNAs 1, 2) and *Renilla* Luciferase (siRNAs 3, 4) When NIH/3T3 Cells Were Treated with 25 nM Modified siRNAs

に高い ^{SM}RNA を用いて同様の実験を行った場合は，約 1.5 倍に作用の延長が観察された．一方，これらの RNA はいくらヌクレアーゼ抵抗性が高いといっても，いずれは加水分解される．したがって，その場合に生成する修飾ヌクレオシドの毒性が問題になる．ヌクレオシドは一般的には代謝活性化（主にリン酸化されヌクレオチドに代謝される）を受けるので，修飾ヌクレオシドが代謝される場合には種々の核酸代謝酵素の阻害につながり細胞毒性を示す可能性がある．^{SM}RNA の構成ヌクレオシドである 4 種類の 2′-*O*-Me-4′-チオリボヌクレオシドはいずれも 100 μM の濃度でがん細胞（CCRF-CEM 細胞，ヌクレオシド系代謝拮抗剤に感受性が高い細胞）に細胞毒性を示さなかった．したがって，^{SM}RNA は，核酸創薬の材料として好都合であると考えられ，現在，*in vivo* 試験を検討中である．

4. おわりに

アンチセンス創薬時代から RNAi 創薬時代にかけてのわれわれのヌクレアーゼ抵抗性核酸創出の試みについて駆け足で述べた．4′-*C*-アミノアルキル化した DNA や 2′-*O*-Me-4′-チオ RNA は多くの点で優れた性質を持つことが明らかになった．アンチセンス創薬時代には不明であった多くの重要な生物学的発見（特に自然免疫に関する発見）が近年相ついでいること，及び，核酸化学の発展により毒性（off-target 効果）を回避した核酸創薬が可能になる時代に突入している．今後，機能性核酸の細胞内器官及び組織・細胞特異的な送達法の開発が必要であるが，それらの研究もかなり進展しつつある．核酸創薬はリスキーであるがゆえにチャレンジングである．だからこそ，アカデミックで基礎研究を展開する意味がある．アンチセンス創薬時代には，雨後の竹の子のように設立されたバイオベンチャーが，投資家対策で臨床試験を慌てて行い失敗を続けた．しかし，RNAi 創薬時代では，大手製薬会社から十分な資金援助を受けた核酸創薬欧米バイオベンチャーが慌てずにしかも着実に駒を進めつつある．日本は抗体医薬開発競争で欧米に大きく遅れた．この轍を二度と踏まないように，国家戦略として日本独自の核酸創薬を中心にした高分子創薬を進めたいものである．

謝辞　終わりに臨み，本研究は引用論文に記載の多くの学生諸君・教員の努力の賜でありこの場を借りて深く感謝します．

REFERENCES

1) Kawai T., Akira S., *Nature immunol.*, **11**, 373–384 (2010).
2) Yang W., *Quart. Rev. Biophys.*, doi: 10.1017/S0033583510000181 (2010).
3) Frank Bennett C., Swayze E. E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **50**, 259–293 (2010).
4) Jain A. K., Bhattachary S., *Bioconjugate Chem.*, **21**, 1389–1403 (2010).
5) Mulhbacher J., St-Pierre P., Lafontaine D. A., *Curr. Opin. Pharmacol.*, **10**, 551–556 (2010).
6) Bouchard P. R., Hutabarat R. M., Thompson K. M., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **50**, 237–257 (2010).

7) Gambari R., Borgatti M., Bezzerri V., Nicolis E., Lampronti I., Dechechi M. C., Mancini I., Tamanini A., Cabrini G., *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 1887–1894 (2010).
8) Jackson A. L., Linsley P. S., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 57–67 (2010).
9) Kropinski A. M. B., Bose R. J., Warren R. A. J., *Biochemistry*, **12**, 151–157 (1973).
10) Matsuda A., Ueno Y., Takenaka A., "Frontiers in Nucleosides and Nucleic Acids, Thermal stability and nuclease-resistance properties of oligonucleotides having an aminoalkyl side chain at the nucleobase and sugar moieties," eds. by Schinazi R. F., Liotta D. C., IHL Press, Tucker, 2004, pp. 549–576.
11) Ono A., Haginoya N., Kiyokawa M., Minakawa N., Matsuda A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 361–366 (1994).
12) Haginoya N., Ono A., Nomura Y., Ueno Y., Matsuda A., *Bioconjugate Chem.*, **8**, 271–280 (1997).
13) Juan E. C. M., Kondo J., Kurihara T., Ito T., Ueno Y., Matsuda A., Takenaka A., *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1969–1977 (2007).
14) Ueno Y., Kumagai I., Haginoya N., Matsuda A., *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3777–3782 (1997).
15) Itoh T., Ueno Y., Komatsu Y., Matsuda A., *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2514–2523 (2003).
16) Nomura Y., Ueno Y., Matsuda A., *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2784–2791 (1997).
17) Ueno Y., Mikawa M., Matsuda A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2863–2866 (1997).
18) Ueno Y., Mikawa M., Matsuda A., *Bioconjugate Chem.*, **9**, 33–39 (1998).
19) Nara H., Ono A., Matsuda A., *Bioconjugate Chem.*, **6**, 54–61 (1995).
20) Ueno Y., Ogawa A., Nakagawa A., Matsuda A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 2817–2822 (1996).
21) Ueno Y., Nakagawa A., Matsuda A., *Nucleosides Nucleotides*, **17**, 283–289 (1998).
22) Nomura Y., Haginoya N., Ueno Y., Matsuda A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 2811–2816 (1996).
23) Wang G., Seifert W. F., *Tetrahedron Lett.*, **37**, 6515–6518 (1996).
24) Shuto S., Kanazaki M., Ichikawa S., Minakawa N., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **63**, 746–754 (1998).
25) Ueno Y., Nagasawa Y., Sugimoto I., Kojima N., Kanazaki M., Shuto S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **63**, 1660–1667 (1998).
26) Kanazaki M., Ueno Y., Shuto S., Matsuda A., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2422–2432 (2000).
27) Ikemoto N., Kim H.-S., Kanazaki M., Ueno Y., Shuto S., Matsuda A., Wataya Y., *Nucleic Acids Sympo. Ser.*, **42**, 89–90 (1999).
28) Ueno Y., Tomino K., Sugimoto I., Matsuda A., *Tetrahedron*, **56**, 7903–7907 (2000).
29) Atsumi N., Ueno Y., Kanazaki M., Shuto S., Matsuda A., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 2933–2939 (2002).
30) Yamamoto Y., Shuto S., Tamura Y., Kodama T., Hoshika S., Ichikawa S., Ueno Y., Ohtsuka E., Komatsu Y., Matsuda A., *Biochemistry*, **43**, 8690–8699 (2004).
31) Ueno Y., Karino N., Matsuda A., *Bioconjugate Chem.*, **11**, 933–940 (2000).
32) Dan A., Yoshimura Y., Ono A., Matsuda A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **3**, 615–618 (1993).
33) Ono A., Dan A., Matsuda A., *Bioconjugate Chem.*, **4**, 499–508 (1993).
34) Ueno Y., Matsuda A., *Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi*, **61**, 890–899 (2003).
35) Shuto S., Kanazaki M., Sugimoto I., Ichikawa S., Nagasawa Y., Ueno Y., Abe H., Minakawa N., Sukeda M., Kodama T., Nomura M., Matsuda A., "Recent Advances in Nucleosides: Chemistry and Chemotherapy, Development of new radical reactions with a vinylsilyl group and their application to the synthesis of branched-chain sugar nucleosides," ed. by Chu C. K., Elsevier Science B. V., Amsterdam, 2002, pp. 21–55.
36) Matsuda A., *Farumashia*, **38**, 293–295 (2002).
37) Shuto S., Kanazaki M., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **62**, 5676–5677 (1997).
38) Sugimoto I., Shuto S., Matsuda A., *Synlett*, 1766–1768 (1999).
39) Shuto S., Sugimoto I., Abe H., Matsuda A., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 1343–1351 (2000).
40) Sugimoto I., Shuto S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **64**, 7153–7157 (1999).
41) Sukeda M., Shuto S., Sugimoto I., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **65**, 8988–8996 (2000).
42) Kodama T., Shuto S., Nomura M., Matsuda A., *Chem. Eur. J.*, **7**, 2332–2340 (2001).

43) Sukeda M., Ichikawa S., Matsuda A., Shuto S., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **41**, 4748–4750 (2002).
44) Sukeda M., Ichikawa S., Matsuda A., Shuto S., *J. Org. Chem.*, **68**, 3465–3475 (2003).
45) Sukeda M., Matsuda A., Shuto S., *Tetrahedron*, **61**, 7865–7873 (2005).
46) Sugimoto I., Shuto S., Mori S., Shigeta S., Matsuda A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 385–388 (1999).
47) Shuto S., Ichikawa S., Abe H., Matsuda A., *Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi*, **66**, 50–59 (2008).
48) Yahiro Y., Ichikawa S., Shuto S., Matsuda A., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 5527–5531 (1999).
49) Shuto S., Terauchi M., Yahiro Y., Abe H., Ichikawa S., Matsuda A., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 4151–4155 (2000).
50) Shuto S., Yahiro Y., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **65**, 5547–5557 (2000).
51) Terauchi M., Matsuda A., Shuto S., *Tetrahedron Lett.*, **46**, 6555–6558 (2005).
52) Terauchi M., Yahiro Y., Abe H., Ichikawa S., Tovey S. C., Dedos S. G., Taylor C. W., Potter B. V. L., Matsuda A., Shuto S., *Tetrahedron*, **61**, 3697–3707 (2005).
53) Terauchi M., Abe H., Tovey S. C., Dedos S. G., Taylor C. W., Paul M., Trusselle M., Potter B. V. L., Matsuda A., Shuto S., *J. Med. Chem.*, **49**, 1900–1909 (2006).
54) Minakawa N., Hoshika S., Inoue N., Kato Y., Matsuda A., *Frontiers in Organic Chemistry*, **1**, 79–102 (2005).
55) Naka T., Nishizono N., Minakawa N., Matsuda A., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 6297–6300 (1999).
56) Minakawa N., Kaga D., Kato Y., Kobayashi K., Tanaka M., Sasaki T., Matsuda A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2182–2189 (2002).
57) Naka T., Minakawa N., Abe H., Kaga D., Matsuda A., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7233–7243 (2000).
58) Hoshika S., Minakawa N., Matsuda A., *Nucleic Acids Res.*, **32**, 3815–3825 (2004).
59) Kato Y., Minakawa N., Komatsu Y., Kamiya H., Harashima H., Matsuda A., *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2942–2951 (2005).
60) Takahashi M., Minakawa N., Matsuda A., *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1353–1362 (2009).
61) Inoue N., Kaga D., Minakawa N., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **70**, 8597–8600 (2005).
62) Inoue N., Minakawa N., Matsuda A., *Nucleic Acids Res.*, **34**, 3476–3483 (2006).
63) Inoue N., Shionoya A., Minakawa N., Ogawa N., Matsuda A., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 15424–15425 (2007).
64) Matsugami A., Ohyama T., Inada M., Inoue N., Minakawa N., Matsuda A., Katahira M., *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1805–1812 (2008).
65) Minakawa N., Sanji M., Kato Y., Matsuda A., *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 9450–9456 (2008).
66) Hoshika S., Minakawa N., Kamiya H., Harashima H., Matsuda A., *FEBS Lett.*, **579**, 3115–3118 (2005).
67) Hoshika S., Minakawa N., Shionoya A., Imada K., Ogawa N., Matsuda A., *ChemBioChem*, **8**, 2133–2138 (2007).