

## ゲノムテクノロジー基盤素材としての架橋型人工核酸 BNA

小比賀 聡

## Bridged Nucleic Acids (BNAs) as a Basic Material for Genome Technology

Satoshi OBIKA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan

(Received July 30, 2004)

The completion of the human genome sequencing project will greatly accelerate the development of novel and practical technologies for genome-analysis, diagnostics or therapeutics. Oligonucleotides are playing an important role in these genome technologies, because of their sequence-specific hybridization ability toward the complementary strand. Besides the sequence-specific duplex formation, oligonucleotides are able to form stable triplex structures, which is fundamental to the antigene strategy to regulate gene expression in a living cell. However, two major drawbacks are known in the triplex formation by a natural oligonucleotide: low stability of the triplex and limitations of the target DNA sequence. One promising strategy to overcome these problems is chemical modification of the oligonucleotides. We have developed various bridged nucleic acids (BNAs), and found that the oligonucleotides containing 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid (2',4'-BNA) modification form a stable parallel motif triplex with the double-stranded DNA target under physiological conditions. Some nucleobase analogues to extend the target DNA sequence were designed, synthesized and incorporated into the 2',4'-BNA structure. The obtained 2',4'-BNA derivatives containing modified nucleobases effectively recognized a pyrimidine-purine interruption. Some other examples of nucleic acid analogues to overcome the two major drawbacks in the triplex-forming oligonucleotides are also summarized.

**Key words**—nucleic acid analogue; triplex; antigene; sugar conformation; bridged nucleic acid; locked nucleic acid

## 1. はじめに

ヒトゲノムプロジェクトの終結が2003年4月に宣言され、今やわれわれは名実ともにポストゲノム時代のまっただ中にあると言える。約30億塩基対もの長さのヒトゲノム配列が解読されたことにより、医療や産業には大きな変革がもたらされようとしており、社会的にも、一塩基多型 (SNP) に基づくテーラーメイド医療やゲノム情報に基づく分子標的医薬、そして遺伝子を直接標的とした新しい遺伝子医薬などの実現に高い期待が寄せられている。筆者らは、こうしたポストゲノム時代における様々な先端医療や産業の基盤を担う新しいテクノロジーを確立すべく、化学修飾を施した人工的な核酸分子の開発研究に取り組んでいる。筆者らが注目するポ

ストゲノム基盤テクノロジーの1つにアンチジーン法がある (Fig. 1)。生体内においてDNAに蓄積された遺伝情報は、mRNAへ転写され、そしてタンパク質へ翻訳される。この一連の流れの中で、DNAからRNAへの転写の過程をオリゴヌクレオチドにより制御しようという手法がアンチジーン法である。ちなみに、mRNAからタンパク質への翻訳過程をオリゴヌクレオチドにより阻害する方法はアンチセンス法として知られている。このアンチジーン法において、細胞へ導入されたオリゴヌクレオチドは、二重鎖DNA中の標的部位へ結合し三重鎖を形成することにより、転写因子-DNA複合体形成を阻害し、DNAからmRNAへの転写過程を抑制する。しかし、後述のように安定な三重鎖核酸の形成にはいくつかの技術的ハードルをクリアしなければならず、そのために化学修飾を施した新たなオリゴヌクレオチドの開発が求められている。<sup>1)</sup> また、本法は単に遺伝子発現の抑制だけではなく、オリゴヌクレオチドの更なる高機能化により遺伝子発

大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 吹田市山田丘1-6)

e-mail: obika@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成16年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

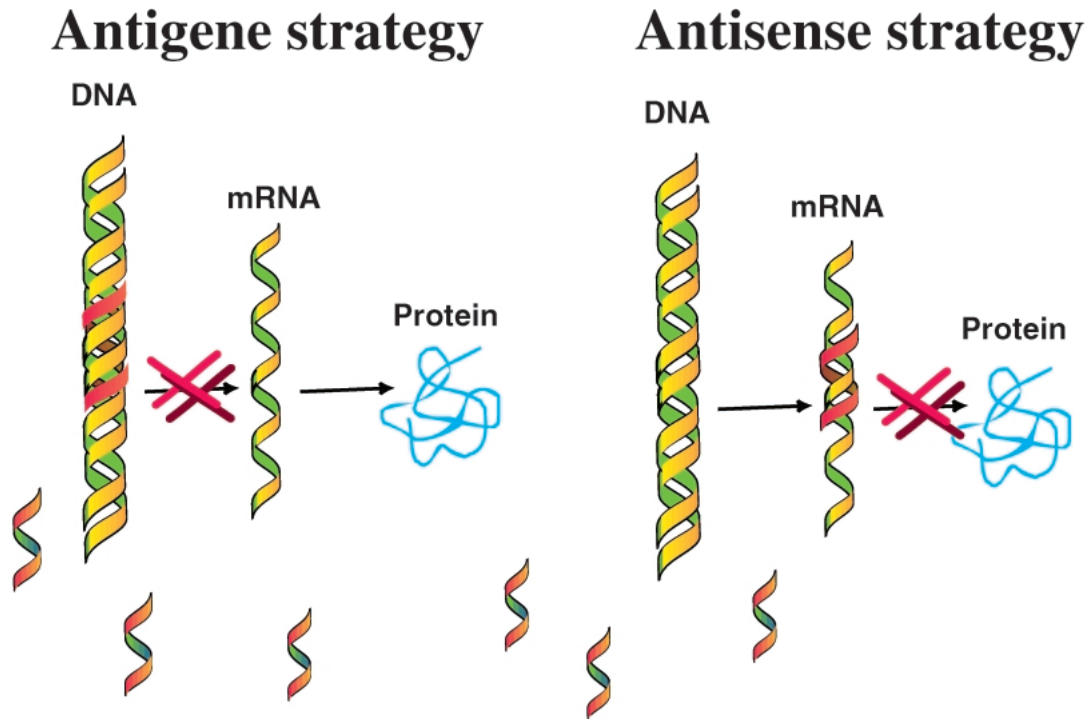


Fig. 1. Schematic Representation of Antisense and Antisense Strategies

現の促進,<sup>2)</sup>あるいは遺伝子変異の導入や変異の修復など<sup>3)</sup>にも利用できるのではないかと期待されている。これ以外にもポストゲノム時代における様々な基盤テクノロジーが提案されているが、多くの場合、核酸分子及びその化学修飾体はその中心的役割を果たしている。

一般に、核酸はその構造上大きく3つの部分に分けることができる (Fig. 2)。まず1番目としてアデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T)、そしてウラシル (U) といった核酸塩基部である。このうちアデニンとグアニンはプリン塩基、そしてシトシン、チミン、ウラシルはピリミジン塩基と呼ばれている。第2には糖部が挙げられる。RNA 及び DNA はそれぞれ5員環の5炭糖であるリボース及びデオキシリボースを含んでいる。このリボース及びデオキシリボースのC1'位に核酸塩基が結合しヌクレオシドとなる。第3にはそのヌクレオシドとヌクレオシドをつなぐリン酸ジエステル結合部である。通常、ヌクレオシドの3'位水酸基と5'位水酸基間がリン酸ジエステル結合により結ばれていくことで長鎖の核酸が形成されている。このような核酸分子の構造のうち、筆者らが最初に注目したのは糖部である。一般に核酸糖部のフラノース環

は平面ではなく1つあるいは2つの原子が平面の上下に位置するエンベロープあるいはツイスト型と呼ばれる構造を取っているが、<sup>4)</sup>ヌクレオシド中、あるいは一本鎖の核酸中では比較的自由度が高く、様々な立体配座の平衡状態で存在している。ところが、相補鎖核酸と二重鎖を形成するあるいは二重鎖DNAと三重鎖を形成するといった過程においてその自由度は大きく制限されてしまい、エントロピー的に核酸の二重鎖、三重鎖形成過程は不利となる。そこで、核酸のフラノース環をあらかじめ二重鎖や三重鎖核酸を形成するのに適した構造に固定しておけば、二重鎖や三重鎖を形成する際のエントロピーの損失を防ぐことができると考えられる。このような考えに基づき、核酸の立体配座制御法が考案されるとともにそのいくつかについてはこれまでに実践されてきた。<sup>5,6)</sup>中でも、Leumannらのbicyclo-DNA<sup>7-9)</sup>は核酸のリボフラノース環を二環式骨格とすることで、フラノース環やリン酸ジエステル結合の自由度を束縛しようとしたものであった (Fig. 3)。このbicyclo-DNAは際立った三重鎖安定化効果を示すには至らなかったが、<sup>9)</sup>その後の人工核酸の開発研究に大きな影響を与えるものであった。

一方、筆者らは標的遺伝子の発現を mRNA レベ

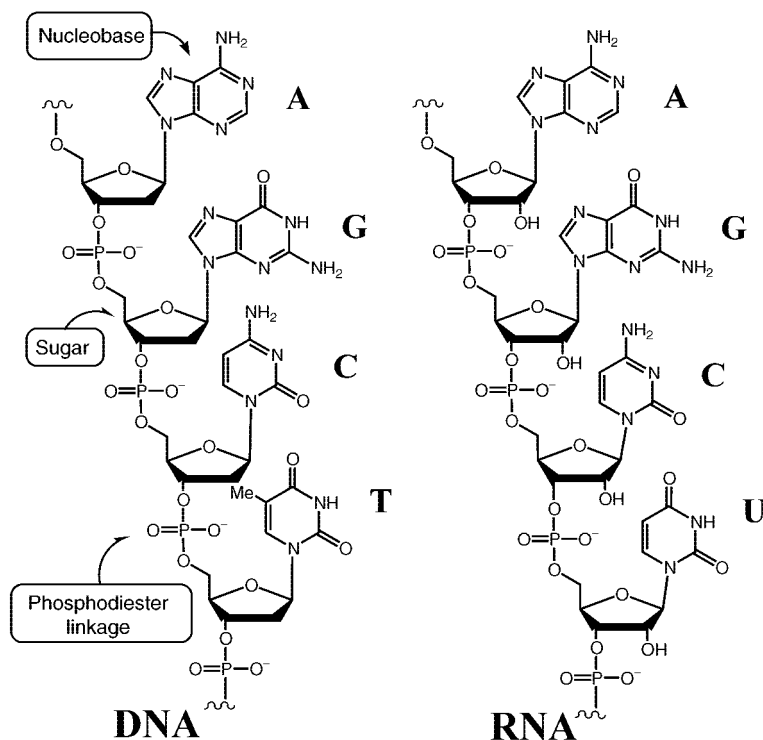


Fig. 2. Structures of DNA and RNA

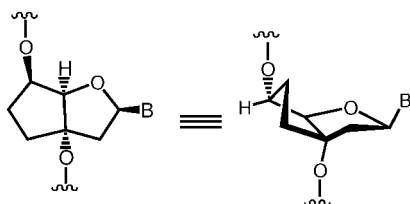


Fig. 3. Structure of the Bicyclo-DNA

ルで抑制するアンチセンス法への適用を念頭に、新しい糖部架橋型人工核酸 (Bridged Nucleic Acid: BNA) の開発を行ってきた。<sup>10-12)</sup> アンチセンス法における標的分子である RNA は、DNA とは異なり N 型の糖部立体配座を取り易く、結果として、RNA からなる二重らせんは A 型らせん構造を取ることが知られていた (Fig. 4).<sup>4)</sup> そこで、核酸の糖部立体配座を RNA と同じ N 型に厳密に固定するために、RNA の 2' 位酸素原子と 4' 位炭素原子間をメチレン鎖にて架橋した 2',4'-BNA を設計し、世界に先駆けその合成を達成した (Fig. 5).<sup>13)</sup> この 2',4'-BNA を含むオリゴヌクレオチドは標的となる RNA に極めて強固に結合し安定な二重鎖を形成することが見出された。<sup>14)</sup> これ以外にも、RNA の 3' 位酸素原子と 4' 位炭素原子間をメチレン架橋した 3',4'-BNA<sup>15-19)</sup> や、3' 位炭素原子と 4' 位炭素原子か

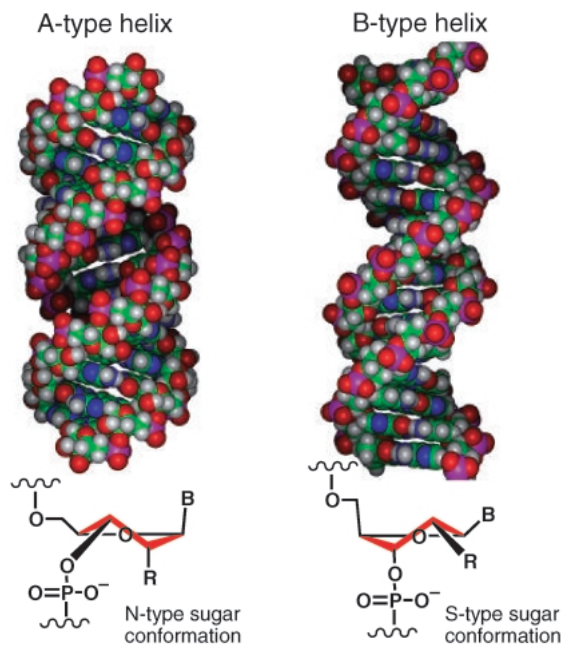


Fig. 4. Illustrations of A-type Helical Structure and N-form Sugar Conformation (Left), and B-type Helix and S-form Sugar Conformation (Right)

らトランス形で縮環した *trans*-3',4'-BNA 等<sup>20,21)</sup> を始めいくつかの BNA 類<sup>22-24)</sup> の合成に成功してきた (Fig. 5). これら BNA はそれぞれ糖部立体配座が異なっており、オリゴヌクレオチドへ導入した際に

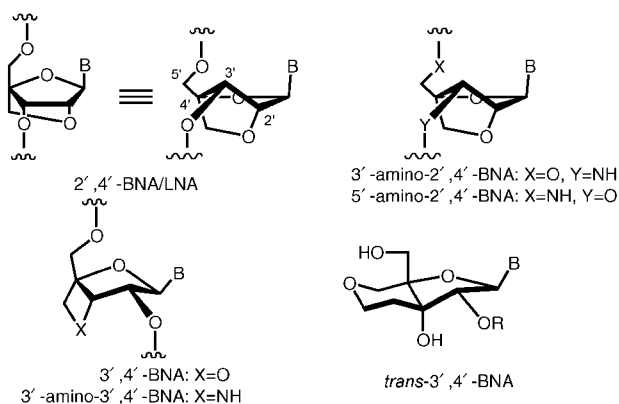


Fig. 5. Structures of the 2',4'-BNA/LNA and Other BNA Families

は固有の興味深い特性を示すことを明らかにしている。これら BNA のうち 2',4'-BNA については、われわれの報告の直後に Wengel らによってもその合成が達成されており、<sup>25-29)</sup> LNA (Locked Nucleic Acid) という名称で世界的に広まるとともに、現在では大手オリゴヌクレオチドベンダーである Prologo 社等からも入手できるようになっている。<sup>30)</sup> これら BNA (特に 2',4'-BNA/LNA) の設計・合成の経緯については既に総説として発表済みであるのでそちらを参照していただきたい。<sup>10-12)</sup> また、2',4'-BNA/LNA の二重鎖形成能等についても既にいくつかの総説としてまとめられているので、<sup>10-12,28,29,31)</sup> ここでは割愛させていただく。本稿では、ポストゲノム時代の新しいテクノロジーとして期待されているアンチジーン法の基盤となる「三重鎖形成核酸」について焦点を絞り、筆者らのこれまでの取り組みを中心に概説したい。

## 2. 三重鎖核酸形成の基礎とその問題点

核酸分子が三重らせん構造を形成するという事実は、Watson と Crick が DNA の二重らせん構造を発表してまだ間もない 1957 年に既に発見されている。<sup>32,33)</sup> そして程なくして Hoogsteen によってその水素結合様式が実験的に確かめられた。<sup>34,35)</sup> その後の研究により、三重鎖核酸形成の様式は次の 2 つに大別されている。<sup>36)</sup> 1 つは、Hoogsteen 型の水素結合を介するもので、二重鎖 DNA 中のプリン鎖と三本鎖目のピリミジン鎖が平行に (それぞれの鎖の 5' 末端, 3' 末端が同じ向きに) 配向している (平行型三重鎖)。これに対して、reverse-Hoogsteen 型水素結合を介する三重鎖形成様式では、二

重鎖 DNA 中のプリン鎖と三本鎖目のプリン鎖がアンチ平行に配向している (アンチ平行型三重鎖) (Fig. 6)。いずれの様式においても、標的三重鎖 DNA には連続するプリン領域が必要であり、ピリミジン塩基がこのホモプリン領域に 1 カ所でも存在すると安定な三重鎖核酸は形成できない。さらに、Hoogsteen あるいは reverse-Hoogsteen 型結合はいずれの場合も 2 本の水素結合により成り立っており、GC 塩基対において 3 本の水素結合を形成する Watson-Crick 型結合と比べてその安定性が低いことはいなめない。また、平行型三重鎖では GC 塩基対の G を認識する際に、3 位がプロトン化された C が使われるため、酸性条件下では安定な三重鎖を形成し得るものの、中性から塩基性条件においてはその安定性が著しく低下するという問題を有している。これに対してアンチ平行型三重鎖では、用いる三本鎖目の核酸の配列にプリン塩基を多く含むため、三本鎖目の核酸それ自身で複雑な高次構造を形成してしまうという大きな問題を抱えている。筆者らは、これら 2 つの様式のうち平行型三重鎖については核酸の化学構造を修飾することで十分にその問題点を解決可能であると考え研究を行っている。

## 3. 平行型三重鎖核酸の安定化

平行型三重鎖核酸形成においては、三重鎖の安定性が十分ではなく、標的となる配列も A や G が連続するホモプリン配列に限定されるという 2 つの問題が知られている。このうち、三重鎖核酸の安定性向上に関するいくつかの興味深い研究例について紹介する。

安定な三重鎖を形成させるために、どのような化学修飾を核酸構造に施せばよいかを考える上で、三重鎖核酸の正確な構造を知ることは重要である。しかし、これまでに行われてきた三重鎖核酸のらせん構造解析に関するいくつかの報告をみると、構造解析の手法や解析に用いられる塩基配列及び測定条件等の違いにより A 型らせん、B 型らせん、あるいはそれらの中間的な構造など様々な三重らせん構造が提唱されていることが分かる。<sup>36)</sup> そのため、これらの構造解析の結果からはどのような化学修飾が三重鎖核酸の安定化に有効かという明確な指針は残念ながら見えてこない。

一方、先述のように、RNA と DNA には 2' 位の

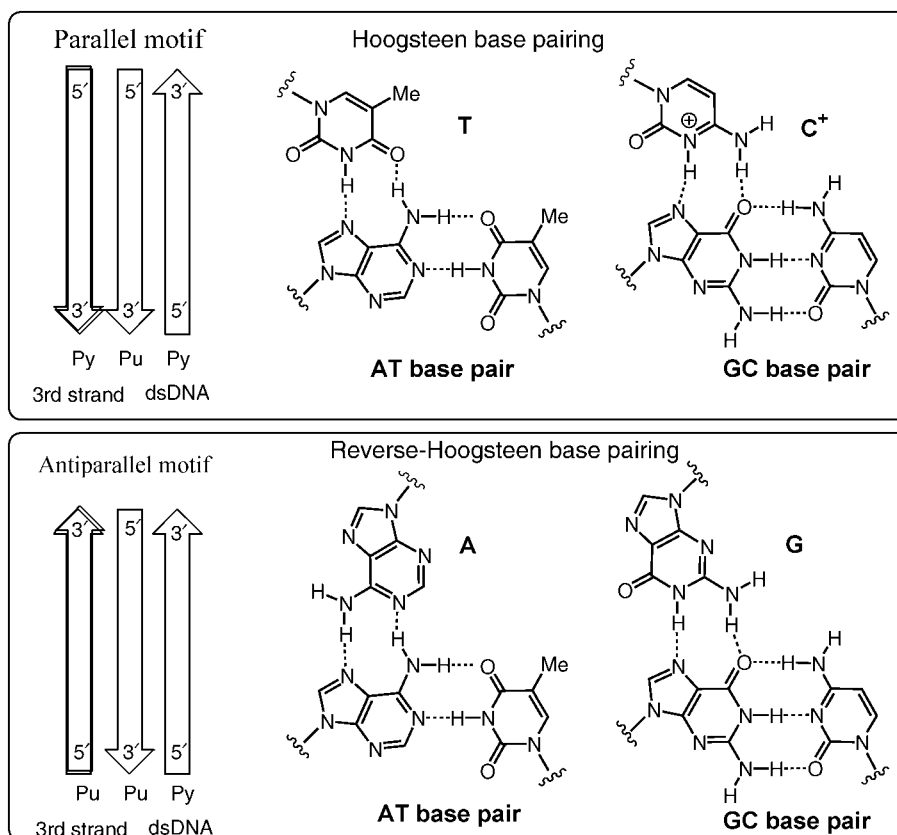


Fig. 6. Schematic and Simplified Drawings of Parallel and Antiparallel Motif Triplexes (Left), and Structures of Hoogsteen and Reverse-Hoogsteen-type Base Triads (Right)

水酸基の有無という比較的小さな化学構造上の違いしかないにも関わらず、それらが形成する二重らせんの構造は大きく異なっていることはよく知られている。<sup>4)</sup> 同様に、三重鎖核酸の形成時においても各鎖がDNAの場合とRNAの場合で三重鎖の安定性がどのように変化するかについて系統的な検討が行われており、標的が二重鎖DNAの場合、おおむね三本鎖目としてRNAのほうがDNAよりも安定な三重鎖を形成し易いという知見が得られている。<sup>37-41)</sup> また、RNAの構造類縁体である2'-O-Me-RNAが二重鎖DNAとともに非常に安定な三重らせんを形成することも報告されている。<sup>37,38)</sup> これらの実験結果から、三重鎖核酸を安定化する三本鎖目の構造としてはRNAに類似した構造が望ましいのではないかと推察された。

Gryaznovらは核酸のリン酸ジエステル結合部分をN3'→P5'ホスホロアミダート結合に置換することで、三重鎖核酸が大きく安定化されることを見出ししている (Fig. 7).<sup>42-45)</sup> このN3'→P5'ホスホロアミダート型オリゴヌクレオチドは、核酸の3'位

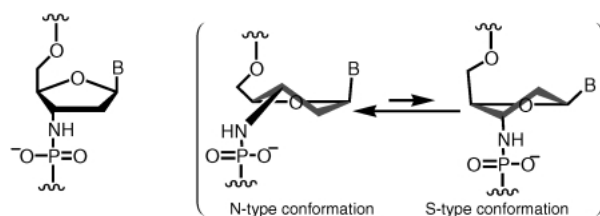


Fig. 7. Structure of N3'→P5' Phosphoramidate Oligonucleotide

酸素原子を窒素原子に置き換えたものであるが、これによりリン酸ジエステル結合部の構造や物性の変化をもたらすばかりではなく、糖部の立体配座がRNAと同じN型を取り易くなると考察されている。<sup>46)</sup> このことにより、N3'→P5'ホスホロアミダート型オリゴヌクレオチドは標的となる二重鎖DNAとの結合親和性が大きく向上したものと考えられる。

一方、われわれの2',4'-BNA/LNAは核酸の2'位酸素原子と4'位炭素原子間をメチレン鎖にて架橋し、糖部立体配座を厳密にN型に固定化したものであるが、これを含むオリゴヌクレオチドは標的

重鎖 DNA に対し極めて強固に結合し、安定な三重鎖核酸を形成することを見出した。<sup>47-50</sup> この三重鎖の安定性については UV 融解曲線測定<sup>47-49</sup> やゲルシフト法,<sup>48,49</sup> あるいは等温滴定型カロリメータ等<sup>49,50</sup> により詳細に検討したが、UV 融解曲線から算出される融解温度 ( $T_m$  値) を指標にすることで、2',4'-BNA/LNA を有するオリゴヌクレオチドの優れた三重鎖形成能が極めて配列選択的であることが分かった。<sup>47</sup> さらに、ゲルシフト法の詳細な解析から、2',4'-BNA/LNA を三本鎖目に含有する三重鎖核酸は天然の DNA のみからなる三重鎖に比べて少なくとも 300 倍以上安定であることが確認された (Fig. 8).<sup>48</sup> また、この安定な三重鎖核酸形成により、DNA 結合活性を持つ転写因子 (NF- $\kappa$ B) と DNA との結合を効果的に阻害することも見出した。<sup>48</sup> これらの知見は、核酸の糖部を RNA と同じく N 型に固定することが安定な三重鎖核酸の形成に非常に有効であることを示すとともに、この 2',4'-BNA/LNA の優れた三重鎖形成能は、転写段階での遺伝子発現を制御するアンチセンス法に有望であることを物語っている。最近になって、2',4'-BNA/LNA の修飾位置や数が三重鎖核酸の安定性に与え

る影響について詳細な解析が報告された。<sup>51</sup> さらに、2'位と4'位の架橋をメチレン鎖からエチレン鎖へ変換した ENA の優れた三重鎖形成能も明らかになった。<sup>52</sup> 今後、2',4'-BNA/LNA を中心とした架橋型人工核酸の三重鎖形成へ向けた展開は益々盛んになっていくものと期待している。

これら以外にも三重鎖構造を安定化させる人工核酸として、インターカレータ分子を導入したオリゴヌクレオチドや、<sup>53</sup> 2'位にアミノエトキシ基を有する DNA アナログも報告されるなど、<sup>54</sup> 多様なアプローチが世界中で活発に展開されており、今後の動向が注目される。

#### 4. パラレル型三重鎖における標的配列の拡張

パラレル型三重鎖においては、Hoogsteen 型水素結合の形成により、AT 塩基対中の A 及び GC 塩基対中の G を認識できるが、TA 塩基対や CG 塩基対といったピリミジン-プリン塩基対を識別し安定な三重鎖を形成することは困難である。この問題の解決に向けて、様々な非天然核酸塩基がこれまでに開発されてきた。<sup>55</sup> その先駆的な研究例として、Dervan たちが開発した  $D_3$  と呼ばれる非天然ヌクレオシドが挙げられる (Fig. 9).<sup>56</sup> この  $D_3$  は二重

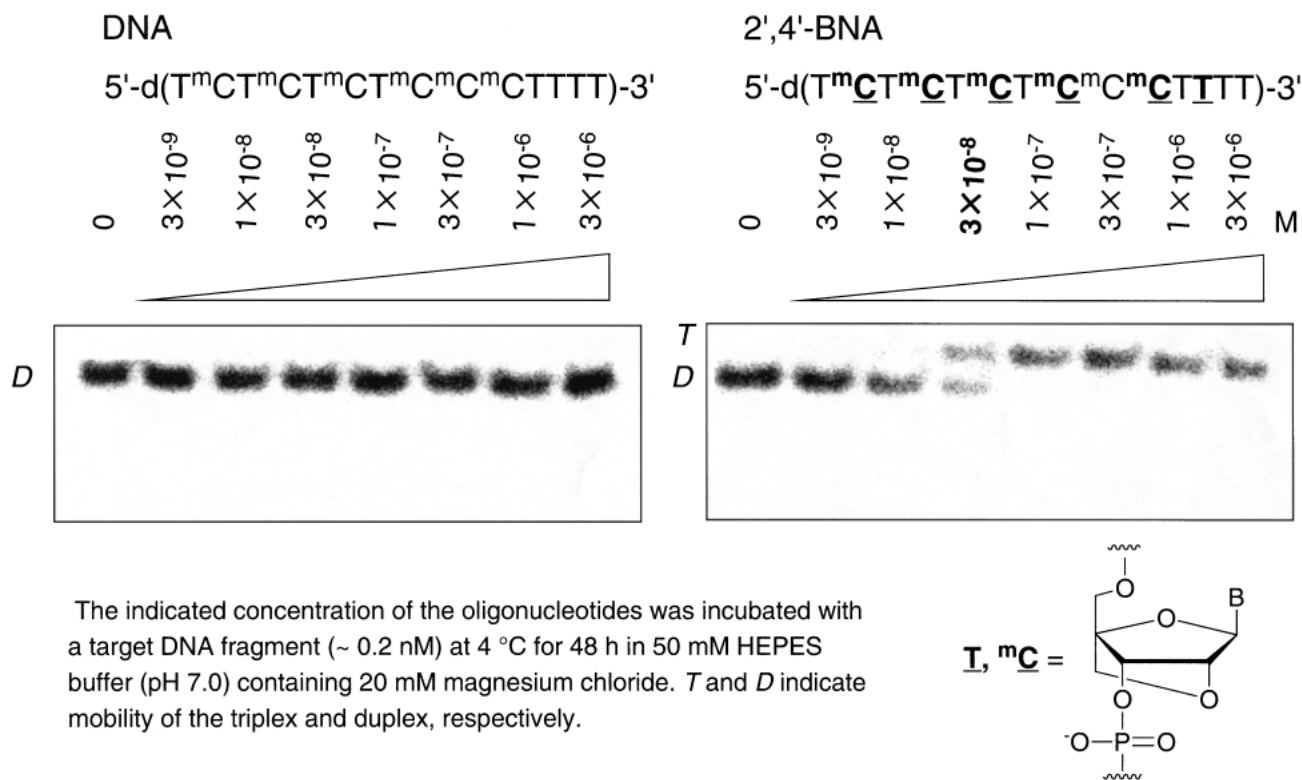


Fig. 8. Gel-Retardation Experiments Showing Significant Binding Affinity of the 2',4'-BNA Modified TFO to the Target dsDNA

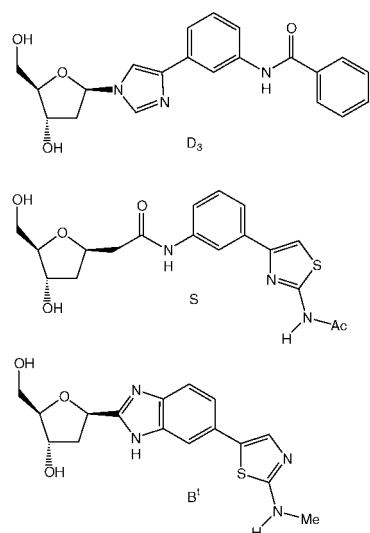


Fig. 9. Structures of the Nucleoside Analogues to Recognize TA Interruption

鎖 DNA 中のピリミジン-プリン塩基対に選択的に結合することが見いだされた。この  $D_3$  とピリミジン-プリン塩基対との間にどのような水素結合が形成されているのかという点については当初明らかにされていなかったが、その後の研究により、 $D_3$  は Hoogsteen 型水素結合を形成してピリミジン-プリン塩基対を認識しているのではなく、インターカレータとして働いているという知見が示された。<sup>57)</sup> この知見をもとに、TA 塩基対のより厳密な認識を狙った新しい核酸塩基アナログ  $S$  が Sun らによって開発された (Fig. 9)。<sup>58)</sup> この  $S$  に関しては水素結合による TA 塩基対の認識が提唱されている。また、彼らはチアゾリルベンズイミダゾール類を塩基部に持つ新たな類縁体  $B^1$  を合成し、その TA 塩基対認識能についても評価を行っている (Fig. 9)。<sup>59)</sup>

一方、CG 塩基対の認識に関しては、よりシンプルな構造を持つ非天然塩基の開発が行われてきた。Leumann らはチミンの 4 位カルボニル基を欠いた  ${}^4\text{HT}$  を用い CG 塩基対の認識を報告した (Fig. 10)。<sup>60)</sup> しかし、この時点では  ${}^4\text{HT}$  の 2 位のカルボニル基と 3 位の窒素原子のいずれが CG 塩基の認識に関わっているか明らかではなかった。ほぼ同じ頃、われわれは CG 塩基対に対して T や C 等のピリミジン塩基が比較的高い親和性を有していることを見い出しており、<sup>47)</sup> これらの知見から CG 塩基対の認識にはピリミジンの 2 位カルボニル基が重要であるとの結論に至った。そこで、これを実証するた

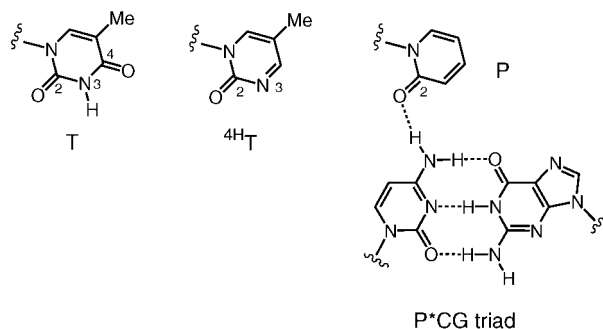


Fig. 10. Structures of T,  ${}^4\text{HT}$  and P\*CG Triad

めに、 ${}^4\text{HT}$  よりシンプルな 2-ピリドン (P) を塩基部分を持つヌクレオシド類縁体を合成し、その CG 塩基対との結合親和性について詳細な解析を行った (Fig. 10)。<sup>61-63)</sup> その結果、P は効果的に CG 塩基対を認識することが分かった。すなわち、この結果より T や C あるいは  ${}^4\text{HT}$  の 2 位のカルボニル基が C の 4 位アミノ基と相互作用するというを確認することができた。このように P は CG 塩基対を効果的に認識したが、その結合親和性は十分なものであるとはいえなかった。そこで、次にこの P を 2',4'-BNA 骨格へ導入することで、三重鎖核酸の安定化を行いつつ CG 塩基対の認識が可能ではないかと考えた。実際に合成を行った 2',4'-BNA-P は当初の予想どおり、CG 塩基対に対する選択的認識能を保持しつつ、十分な三重鎖核酸の安定化能をも獲得することに成功した (Fig. 11, Table 1)。<sup>61-63)</sup> この 2',4'-BNA-P を 3 ヲ所導入した 15mer のオリゴヌクレオチドは標的とするホモプリン-ホモピリミジン配列中に含まれる 3 ヲ所の CG 塩基対を認識し、安定な三重鎖を形成することに世界で初めて成功した。<sup>62)</sup> また、いくつかのピリドン構造類縁体についても 2',4'-BNA 骨格へ導入し、その CG 塩基対認識能を詳細に解析している (Fig. 11)。<sup>64,65)</sup> このように、三重鎖の安定性を向上させる糖骨格とピリミジン-プリン塩基対を認識するために設計した修飾核酸塩基を同一分子中に組み込むことで両者が協調して機能し、望み通りの優れた三重鎖形成能を引き出すことができた。

このように非天然塩基を 2',4'-BNA/LNA 骨格へ導入することで、2',4'-BNA/LNA の高機能化が可能であることを実証することができた。これにより、2',4'-BNA/LNA 骨格へ非天然塩基を導入することの重要性は益々高まってきた。そこでわれわれは、



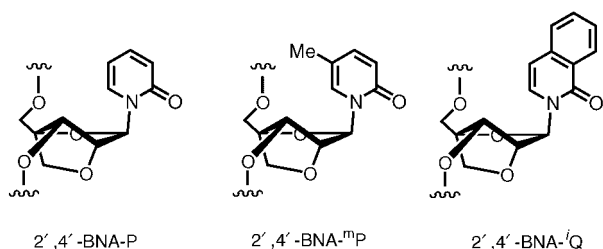


Fig. 11. Structures of 2',4'-BNA-P and Its Derivatives

Table 1.  $T_m$  Values ( $^{\circ}\text{C}$ ) of the Triplexes Comprising Modified TFOs

X	YZ			
	CG	GC	TA	AT
2', 4'-BNA-P	33	19	14	23
2', 4'-BNA- <sup>m</sup> P	32	21	14	23
2', 4'-BNA- <sup>i</sup> Q	29	20	16	15
P	24	16	15	15
T	25	20	17	44

Conditions: 140 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 7.0).

2',4'-BNA/LNA 骨格へ様々なヘテロ環を導入する新たな手法として、C-ヌクレオシド型 2',4'-BNA/LNA の合成経路を検討しその確立に成功した (Fig. 12).<sup>66,67</sup> 本経路は、原料となるアルデヒド体に対し対応するヘテロ環のリチウム塩や Grignard 試薬を反応させ、その後、Mitsunobu 反応にて骨格構築を行うもので、望みの非天然型核酸塩基を有する 2',4'-BNA/LNA 分子を効率的に合成することができる。この経路を利用して合成したオキサゾール環を塩基部分に持つ 2',4'-BNA/LNA が CG 塩基に対して選択的認識能を示すという知見が得られた。<sup>68</sup> さらに、最近になって 2',4'-BNA/LNA の塩基部分にフェノール類を導入した誘導体の合成にも成功し (Fig. 12), これを含むオリゴヌクレオチドがホモプリン-ホモピリミジン配列中に存在する TA 塩基対や UA 塩基対と相互作用し、安定な三重鎖を形成することを見出すことに成功した。<sup>69,70</sup>

### 5. おわりに

以上、筆者らは「核酸の立体配座を架橋構造によって適切に固定化する」というコンセプトのもと、様々な架橋型人工核酸の開発を行ってきた。中でも、2',4'-BNA/LNA は今回紹介したように標的三重鎖

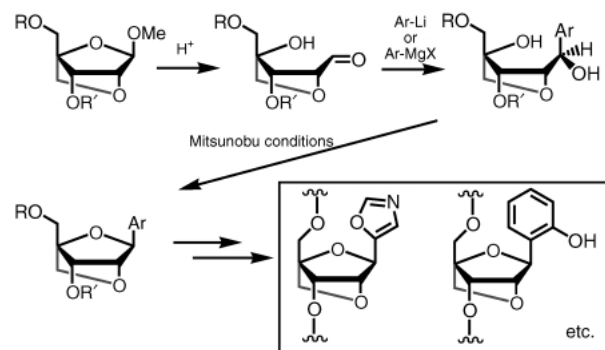


Fig. 12. Synthetic Route for the C-Nucleoside Analogues of 2',4'-BNA/LNA

DNA に対して極めて強固に結合し、安定な三重鎖核酸を形成するばかりか、相補的な DNA や RNA と結合し安定な二重鎖を形成することから、世界中で遺伝子発現の制御や遺伝子検出等への応用に向けた研究が盛んに行われるようになってきた。このように、人工核酸の設計・開発にあたって筆者らが掲げた基本コンセプトは非常にうまく機能したと考えている。現在、様々なポストゲノム基盤テクノロジーの確立に向けて、これら架橋型人工核酸の実践応用を精力的に推進中である。これに加えて、人工核酸の更なる高機能化を目指した新たなタイプの核酸分子の開発研究にも力を注いでいる。

**謝辞** 本研究は、大阪大学大学院薬学研究科において行ったものであり、終始、温かい御指導御助言を賜りました今西 武教授に厚く御礼申し上げます。また、これら成果は数多くの共同研究者の努力の賜物です。この場を借りて心より感謝申し上げます。

また本研究の遂行に際し、文部科学省科学研究費補助金、ヒューマンサイエンス振興財団創薬等ヒューマンサイエンス研究事業、NEDO 即効型産業技術研究助成事業、並びに日本証券奨学財団より援助を賜りました。ここに感謝の意を表します。

### REFERENCES

- 1) Buchini S., Leumann C. J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 717-726 (2003).
- 2) Mapp A. K., *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 2217-2220 (2003).
- 3) Seidman M. M., Glazer P. M., *J. Clin. In-*



- vest., **112**, 487–494 (2003).
- 4) Saenger W., “Principles of Nucleic Acid Structure,” Springer-Verlag, New York, 1984.
  - 5) Herdewijn P., *Liebigs Ann. Chem.*, **1996**, 1337–1348.
  - 6) Kool E. T., *Chem. Rev.*, **97**, 1473–1487 (1997).
  - 7) Tarköy M., Bolli M., Schweizer B., Leumann C., *Helv. Chim. Acta*, **76**, 481–510 (1993).
  - 8) Tarköy M., Bolli M., Leumann C., *Helv. Chim. Acta*, **77**, 716–744 (1994).
  - 9) Bolli M., Leumann C., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 694–696 (1995).
  - 10) Imanishi T., Obika S., *J. Syn. Org. Chem., Jpn.*, **57**, 969–980 (1999).
  - 11) Obika S., *Yakugaku Zasshi*, **120**, 147–158 (2000).
  - 12) Imanishi T., Obika S., *Chem. Commun.*, **2002**, 1653–1659.
  - 13) Obika S., Nanbu D., Hari Y., Morio K., In Y., Ishida T., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8735–8738 (1997).
  - 14) Obika S., Nanbu D., Hari Y., Andoh J., Morio K., Doi T., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5401–5404 (1998).
  - 15) Obika S., Morio K., Nanbu D., Imanishi T., *Chem. Commun.*, **1997**, 1643–1644.
  - 16) Obika S., Morio K., Hari Y., Imanishi T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 515–518 (1999).
  - 17) Obika S., Morio K., Hari Y., Imanishi T., *Chem. Commun.*, **1999**, 2423–2424.
  - 18) Obika S., Morio K., Nanbu D., Hari Y., Itoh H., Imanishi T., *Tetrahedron*, **58**, 3039–3049 (2002).
  - 19) Obika S., Andoh J., Onoda M., Nakagawa O., Hiroto A., Sugimoto T., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **44**, 5267–5270 (2003).
  - 20) Obika S., Sekiguchi M., Osaki T., Shibata N., Masaki M., Hari Y., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **43**, 4365–4368 (2002).
  - 21) Obika S., Osaki T., Sekiguchi M., Somjing R., Harada Y., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **45**, 4801–4804 (2004).
  - 22) Obika S., Andoh J., Sugimoto T., Miyashita K., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 6465–6468 (1999).
  - 23) Obika S., Onoda M., Morita K., Andoh J., Koizumi M., Imanishi T., *Chem. Commun.*, **2001**, 1992–1993.
  - 24) Obika S., Nakagawa O., Hiroto A., Hari Y., Imanishi T., *Chem. Commun.*, **2003**, 2202–2203.
  - 25) Singh S. K., Nielsen P., Koshkin A. A., Wengel J., *Chem. Commun.*, **1998**, 455–456.
  - 26) Koshkin A. A., Singh S. K., Nielsen P., Rajwanshi V. K., Kumar R., Meldgaard M., Olsen C. E., Wengel J., *Tetrahedron*, **54**, 3607–3630 (1998).
  - 27) Wengel J., *Accounts Chem. Res.*, **32**, 301–310 (1999).
  - 28) Orum H., Wengel J., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **3**, 239–243 (2001).
  - 29) Petersen M., Wengel J., *Trends Biotechnol.*, **21**, 74–81 (2003).
  - 30) (<http://www.proligo.com/>)
  - 31) Braasch D. A., Corey D. R., *Chem. Biol.*, **8**, 1–7 (2001).
  - 32) Felsenfeld G., Davies D. R., Rich A., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2023–2024 (1957).
  - 33) Felsenfeld G., Rich A., *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 457–468 (1957).
  - 34) Hoogsteen K., *Acta Crystallogr.*, **12**, 822–823 (1959).
  - 35) Hoogsteen K., *Acta Crystallogr.*, **16**, 907–916 (1963).
  - 36) Soyfer V. N., Potaman V. N., “Triple-Helical Nucleic Acids,” Springer-Verlag, New York, 1995.
  - 37) Escudé C., Sun J. S., Rougée M., Garestier T., Hélène C., *Acad. Sci., Ser. III*, **315**, 521–525 (1992).
  - 38) Escudé C., François J. S., Sun J. S., Ott G., Sprizl M., Garestier T., Hélène C., *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5547–5553 (1993).
  - 39) Roberts R. W., Crothers D. M., *Science*, **258**, 1463–1466 (1992).
  - 40) Wang S., Kool E. T., *Biochemistry*, **34**, 4125–4132 (1995).
  - 41) Han H., Dervan P. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 3806–3810 (1993).
  - 42) Gryaznov S., Chen J.-K., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 3143–3144 (1994).
  - 43) Gryaznov S. M., Lloyd D. H., Chen J.-K., Schultz R. G., DeDionisio L. A., Ratmeyer L., Wilson W. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 5798–5802 (1995).
  - 44) Escudé C., Giovannangeli C., Sun J. S., Lloyd D. H., Chen J. K., Gryaznov S. M., Garestier

- T., Hélène C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 4365–4369 (1996).
- 45) Gryaznov S. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1489**, 131–140 (1999).
- 46) Tereshko V., Gryaznov S., Egli M., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 269–283 (1998).
- 47) Obika S., Hari Y., Sugimoto T., Sekiguchi M., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 8923–8927 (2000).
- 48) Obika S., Uneda T., Sugimoto T., Nanbu D., Minami T., Doi T., Imanishi T., *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 1001–1011 (2001).
- 49) Torigoe H., Hari Y., Sekiguchi M., Obika S., Imanishi T., *J. Biol. Chem.*, **276**, 2354–2360 (2001).
- 50) Torigoe H., Obika S., Imanishi T., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **20**, 1235–1238 (2001).
- 51) Sun B. W., Babu B. R., Sorensen M. D., Zakrzewska K., Wengel J., Sun J. S., *Biochemistry*, **43**, 4160–4169 (2004).
- 52) Koizumi M., Morita K., Daigo M., Tsutsumi S., Abe K., Obika S., Imanishi T., *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3267–3273 (2003).
- 53) Asseline U., Thuong N. T., Hélène C., *New J. Chem.*, **21**, 5–17 (1997).
- 54) Cuenoud B., Casset F., Hüsken D., Natt F., Wolf R. M., Altmann K.-H., Martin P., Moser H. E., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37**, 1288–1291 (1998).
- 55) Luyten I., Herdewijn P., *Eur. J. Med. Chem.*, **33**, 515–576 (1998).
- 56) Griffin L. C., Kiessling L. L., Beal P. A., Gillespie P., Dervan P. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7976–7982 (1992).
- 57) Koshlap K. M., Gillespie P., Dervan P. B., Feigon J., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7908–7909 (1993).
- 58) Guianvarc’h D., Benhida R., Fourrey J.-L., Maurisse R., Sun J.-S., *Chem. Commun.*, **2001**, 1814–1815.
- 59) Guianvarc’h D., Fourrey J.-L., Maurisse R., Sun J.-S., Benhida R., *Org. Lett.*, **4**, 4209–4212 (2002).
- 60) Prévot-Halter I., Leumann C. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2657–2660 (1999).
- 61) Obika S., Hari Y., Sekiguchi M., Imanishi T., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **40**, 2079–2081 (2001).
- 62) Obika S., Hari Y., Sekiguchi M., Imanishi T., *Chem. Eur. J.*, **8**, 4796–4802 (2002).
- 63) Torigoe H., Hari Y., Obika S., Imanishi T., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **22**, 1097–1099 (2003).
- 64) Hari Y., Obika S., Sekiguchi M., Imanishi T., *Tetrahedron*, **59**, 5123–5128 (2003).
- 65) Torigoe H., Hari Y., Obika S., Imanishi T., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **22**, 1571–1573 (2003).
- 66) Obika S., Hari Y., Morio K., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 215–219 (2000).
- 67) Hari Y., Obika S., Sakaki M., Morio K., Yamagata Y., Imanishi T., *Tetrahedron*, **58**, 3051–3063 (2002).
- 68) Obika S., Hari Y., Morio K., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 221–224 (2000).
- 69) Obika S., Hari Y., Inohara H., Imanishi T., *Nucleic Acids Res., Suppl.*, **1**, 171–172 (2001).
- 70) Inohara H., Obika S., Imanishi T., *Nucleic Acids Res., Suppl.* (in press).