

PAPER

メジャーグループ修飾siRNAによる遺伝子サイレンシング効果

Gene Silencing by Major Groove Modified siRNAs

新貝 恭広¹⁾
Yasuhiro Shinkai

苗村 円佳¹⁾
Madoka Naemura

神武 洋二郎²⁾
Yojiro Kotake

藤井 政幸*³⁾
Masayuki Fujii

■Abstract

Small interfering RNA (siRNA) induces RNA interference by forming RNA induced silencing complex (RISC). From a therapeutic point of view, chemical modifications and conjugations of siRNA are powerful strategies to improve their properties toward clinical applications. We can access to siRNA molecules from hydroxyl groups, phosphate backbone, and major groove side and minor groove side of nucleobases. We need to know proper moieties at proper positions for chemical modifications to construct an optimized structure of siRNA.

In the present study, we synthesized and evaluated 10 types of siRNAs bearing C5-modified T. All the siRNAs modified in the antisense strand showed reduced silencing efficiencies. It is to be noted the modified positions which intensively reduced silencing efficiencies are well consistent with the positions having major kinks and turns in the crystal structure of guide strandim & Ago². On the other hand, modification of the sense strand caused less damage to silencing of siRNA and no damage was observed for the modification at s8.

Key Words; RNA interference, siRNA, miRNA, mismatch, DICER, hAgo1, hAgo2, RISC

はじめに

近年、合成小分子核酸により細胞内で遺伝子発現を制御する遺伝子サイレンシング技術が注目を集めている。分子生物学においては遺伝子機能解析のためのツールとして汎用されるようになり、医学においては核酸医薬として様々な病原遺伝子を標的とした疾病治療薬として使用されてい

る。現在までに3つの核酸医薬が承認され、多くの臨床試験が進行している¹⁻⁵⁾。

核酸医薬にはDNAを標的とするアンチジーン核酸 (TFO) やポリピロロールアミド (PPA)、pre-mRNAを標的としてスプライシング編集をするエクソンスキッピング核酸、mRNAやmiRNAを標的とするアンチセンス核酸

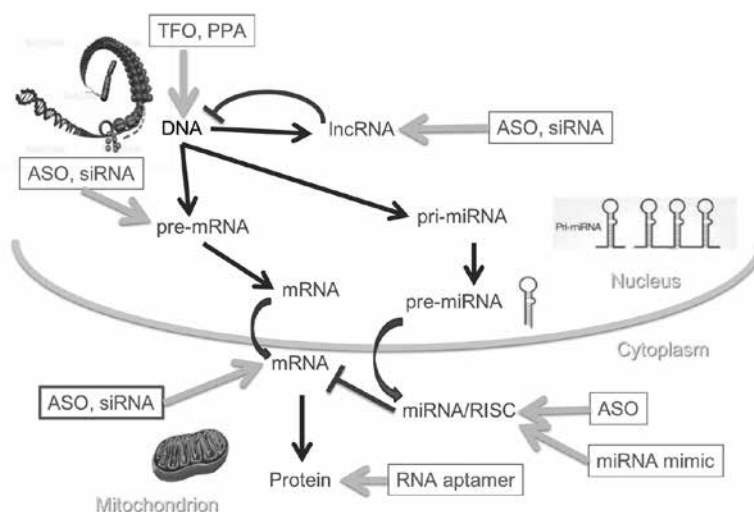


Figure 1. 核酸医薬とその分子標的

- 1) 近畿大学大学院産業理工学研究科産業理工学専攻
- 2) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科准教授
- 3) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科教授 mfujii@fuk.kindai.ac.jp

(ASO) およびsiRNA、タンパク質を標的とするRNAアプタマーなどがある (Figure 1)。

2012年にRISCの中核をなすヒトアルゴノート2 (hAgo2) とmiR-20aガイド鎖複合体のX線結晶構造が解明された⁶⁾。(Figure 2) それにより合理的な分子デザインに基づく化学修飾が可能になり、それまでに得られた化学修飾siRNAのサイレンシング効果が合理的に説明できるようになった。その中で、リン酸化されたガイド鎖5'-末端がMIDドメイン中のY529, K533, N545, K566の側鎖で形成されたカチオン性ポケットに取り込まれて安定化されていることが明らかとなった。また、Helix-7中のIle365が割り込んでa6とa7の間に大きな折れ曲がりを生じ、R710がガイド鎖a9塩基に、R635がa10塩基にスタッキングし

てa9とa10の間に大きな折れ曲がり形成していること、Proline knuckle (Pro67)によりa14塩基がフリップアウトしてArg276にスタッキングしていること、ガイド鎖はa17とa18の間で鋭くターンしていることなど、重要な知見が明らかとなった (Figure 3)。

小分子核酸を核酸医薬として疾病の治療に利用するためには、(1)化学的にも生物学的にも安定である。(2)標的組織、器官に選択的にデリバリーされる。(3)効率よく細胞内に取り込まれる。(4)細胞内で標的の所在する核内か細胞質内に到達できる。(5)標的の遺伝子 (DNAまたはRNA) に配列特異的に強く結合できる。(6)毒性がない。(7)標的以外の遺伝子に作用 (オフターゲット効果) しない。(8)免疫誘導しない。など多くの条件をクリアする必要がある。



Figure 2. hAgo2とmiR-20aガイド鎖複合体のX線結晶構造
Protein Data Bank Japan
<https://pdj.org/mine/summary/4f3t>

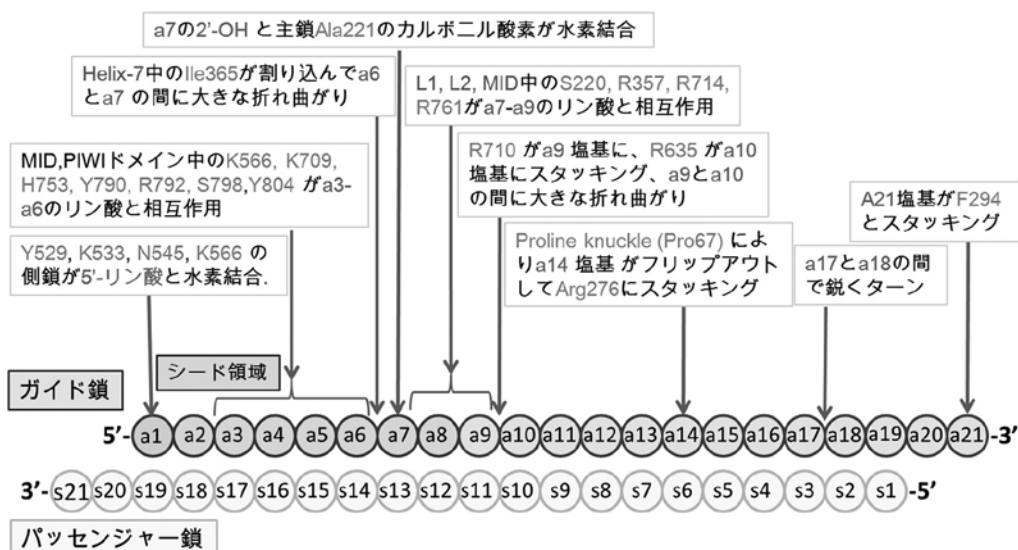


Figure 3. miRNAガイド鎖とhAgo2との相互作用

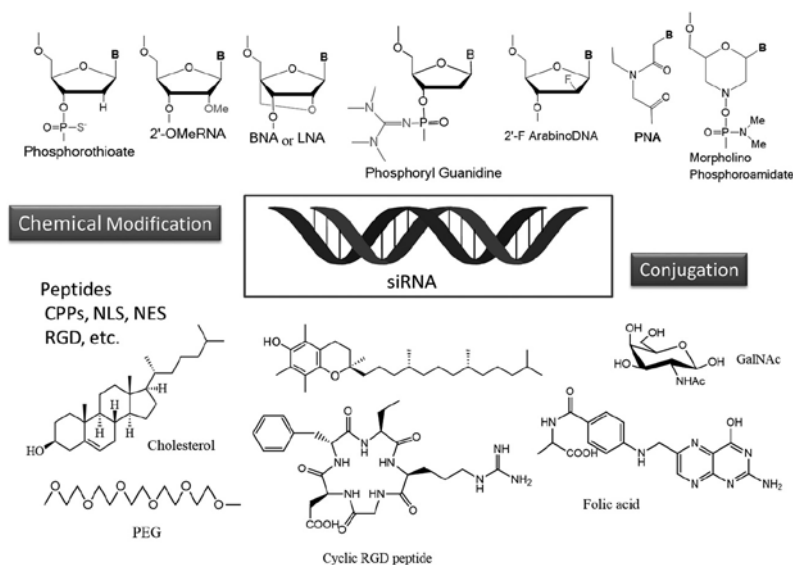


Figure 4. siRNAの化学修飾とコンジュゲート

これらの多くの条件をクリアするために核酸分子の化学修飾、機能性分子とのコンジュゲート、様々なDDS技術などの研究が進められている。核酸を化学修飾する際の部位としてはリボース部位、リン酸部位、塩基部位の3つに大別されるが、塩基部位の修飾では2本鎖を形成した状態でメジャーグループ側（プリン塩基の7、8位とピリミジン塩基の5、6位）とマイナーグループ側（プリン塩基の2位）の修飾があり得る（Figure 4）。

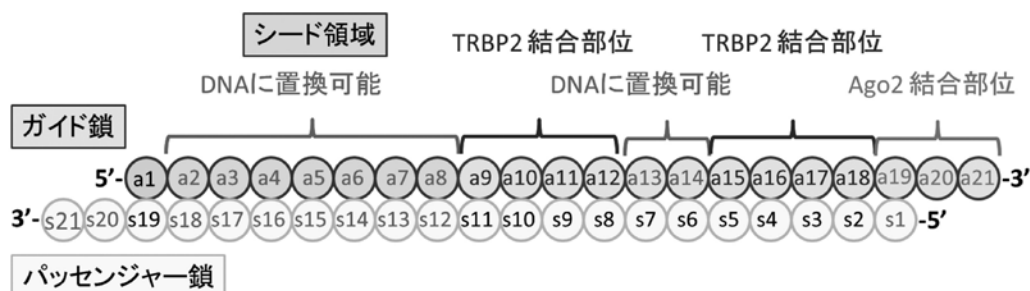
siRNAの遺伝子サイレンシング効果が化学修飾によりどのような影響を受けるのかは、RNAi経路のどの過程にどのように影響するかできるが、特に、siRNAのどちらの鎖がガイド鎖として選択されるのか、RISCの機能を向上させるのか低下させるのかという観点から大変興味深い。

程等の研究グループではsiRNAの各部位を系統的にRNAからDNAに置換してそのサイレンシング効果を比較した。その結果、ガイド鎖のシード領域にあたる2番-8番および13番と14番、パッセンジャー鎖の1番、12番-18番、20番、21番の位置はDNAに置換してもサイレンシング効果の低下は見られなかったと報告している^{7,8)}（Figure 5）。

また、Beal等の研究グループはアデニン塩基7位を修飾したヌクレオチドを組み込んだsiRNAのサイレンシング効果を解析して、ガイド鎖中でサイレンシング効果の低下を招くことがなかったのは12番（a12）と20番（a20）のみで、特に、1番（a1）、3番（a3）、10番（a10）の位置に修飾塩基を導入するとサイレンシング効果は大きく低下したことを報告している⁹⁾。興味深いことに12番（a12）はTRBPの結合部位と20番（a20）はAgo2の結合部位であるとされており、この結果はTRBおよびAgo2はsiRNA二重鎖のマイナーグループからアクセスしていることを示唆している（Figure 6）。

同じBeal等の研究グループはマイナーグループ側になる2位を修飾したプリン塩基(1)を組み込んだsiRNAのサイレンシング効果を解析して、ガイド鎖中で1箇所（14番）、パッセンジャー鎖中で2箇所（3番と16番）ではサイレンシング効果が低下しなかったと報告している¹⁰⁾（Figure 7）。

本研究ではAgo2依存的RNAi経路（siRNA経路）におけるDICER-TRBP/PACTを含むRISCLC（RISC Loading Complex）への取り込み、Ago2を機能的な核とする

Figure 5. siRNA配列の機能区分^{7, 8)}

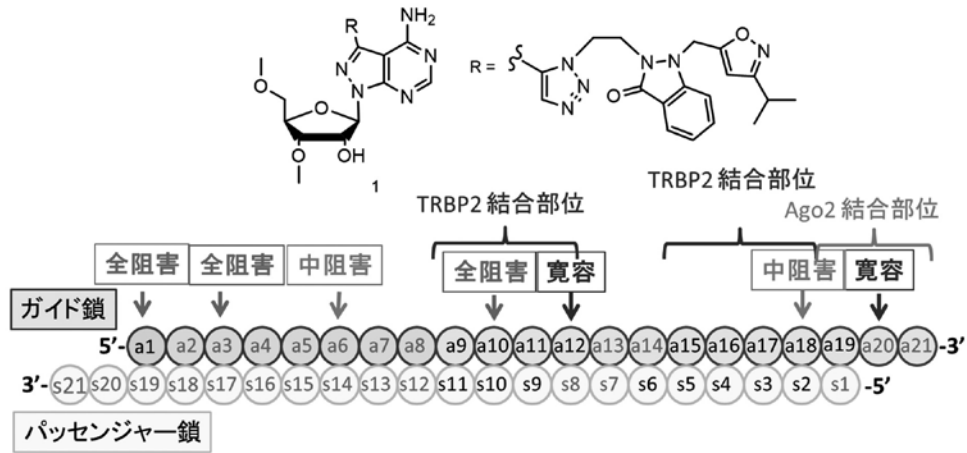


Figure 6. メジャーグループ修飾siRNAのサイレンシング効果⁹⁾

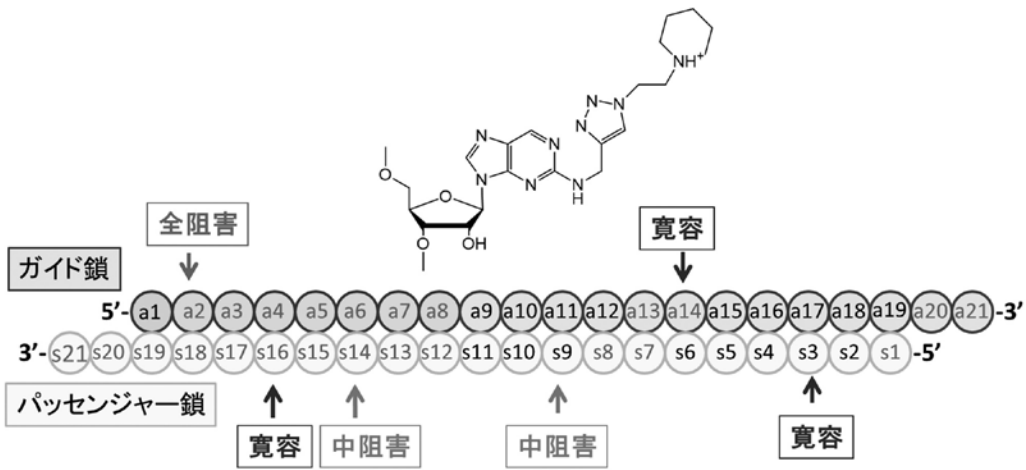


Figure 7. マイナーグループ修飾siRNAのサイレンシング効果¹⁰⁾

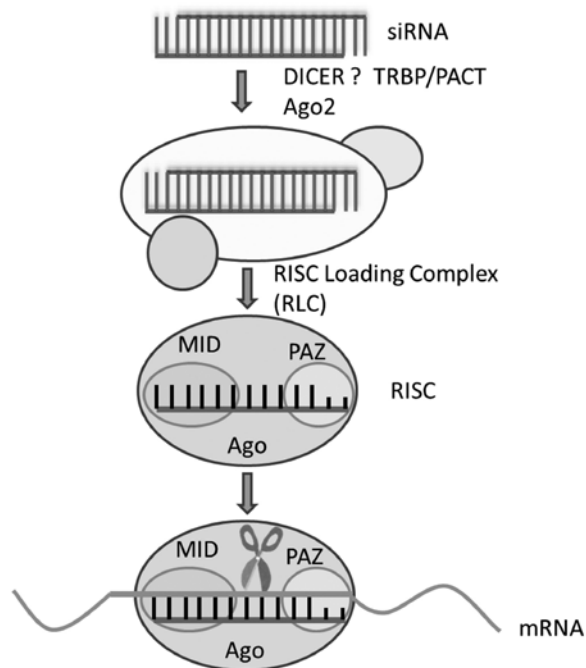


Figure 8. siRNA経路におけるプロセッシング

RISCへの積み込み、パッセンジャー鎖の切断、1本鎖化 (unwinding)、相補的RNAとの結合と切断という一連のプロセスにおいて (Figure 8)、siRNAのメジャーグループ修飾がどのように影響し、オーバーオールな結果としてサイレンシング効果がどのように左右されるかについて検討し、その結果とhAgo2の結晶構造との相関を考察した。

実験

修飾siRNAの合成

オリゴヌクレオチドはDNA/RNA自動合成装置 nS-8 II (Gene Design Inc.) をもちいて標準的シアノエチルホスホアミダイト法により合成した。オリゴヌクレオチドはHewlett-Packard HP-1100システムを用いる逆相HPLCにより精製、分析した。また、精製したオリゴヌクレオチドはMALDI-TOF MS (Voyager-DE, Applied Biosystem) およびESI-MS (amazon SL, Bruker Co.) により同定した。その他の化学薬品は和光純薬株式会社、岸田化学株式会社、東京化成株式会社、ナカライテスク株式会社より購入した。総RNA抽出はRNeasy mini kit (Qiagen) を用いて行い、定量リアルタイムRT-PCRはSuperScript III Platinum One-step Quantitative RT-PCR System™ (Life Technologies 社製) を用いてMX3005P (Agilent Technologies社製) により行った。

細胞培養とsiRNA導入

慢性骨髄性白血病細胞株K-562は加熱処理不活性化10%FBS、ストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ペニシリン (100 U/ml) を含むRPMI-1640 培地中で37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 雰囲気下で培養した。70%コンフルエントの状態です細胞5 $\times 10^5$ cells/mlを24-well プレート (Iwaki, 1 ml cell suspension per plate) 上で抗生物質を含まないRPMI-1640培地中で37 $^{\circ}\text{C}$ で24時間培養した。siRNAを終濃度200

nMとなるように2 μl のLipofectamin 2000™ (Invitrogen) とともにOpti-MEM (Invitrogen) 中、室温で30分間インキュベートし、そのsiRNA- Lipofectamin 2000™ 溶液100 μl と24ウェルプレート上で 900 μl のRPMI-1640培地中のK562細胞 (5 $\times 10^5$ cells/ml) と混和した。

リアルタイム RT-PCRによるBCR/ABL発現定量

白血病株化細胞 (K562) をRPMI-1640 / 10% FBSで0.5 $\times 10^6$ cells/mlに調整した。200 μM ペプチド10 μl と20 μM BCR/ABL siRNA10 μl を混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ で30分間インキュベートした後、24ウェルプレート上で、調整した細胞450 μl とRPMI-1640 / 10% FBS 30 μl と混合した。37 $^{\circ}\text{C}$ (5% CO_2) で24時間培養した後、RNeasy mini kit (Qiagen 社製) を用いて、RNAを抽出した。BCR/ABLのmRNAはTaqManProbeを用いてSuperScript™ III Platinum One-step Quantitative RT-PCR System(Invitrogen社製) によりリアルタイムRT-PCR (Stratagene社製) で定量した。サイクル反応は以下のとおり行った。

実験はすべて3回以上行い、十分な再現性を確保している。各回の測定値はトリプリケート測定値の平均である。

50 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min/1 cycle

94 $^{\circ}\text{C}$ 15 sec 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 sec 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 sec/40 cycle

BCR/ABL mRNA プライマーとTaqMan プローブ

Forward 5' - tgcagatgctgaccaactcg-3'

Reverse 5' - gttccaacgagcggcttcac -3'

TaqMan Probe 5' - FAM-cagtagcatctg accttgagcctcagggtct-BHQ -3'

結果と考察

慢性骨髄性白血病細胞K562に発現するBCR/ABL遺伝子のジャンクション部位を標的とするsiRNA (Native) のUの位置にメジャーグループ側にあたる5位を修飾したT*を

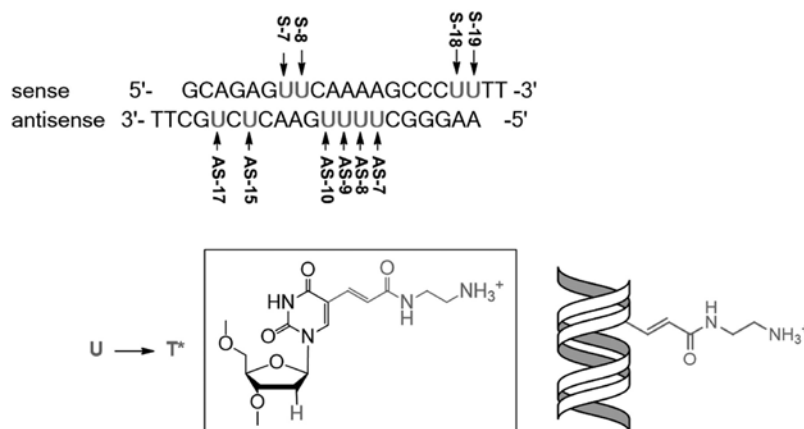


Figure 9. T*とT*を組み込んだsiRNAの構造

BCR/ABL mRNA(355-390)の標的配列
 5'-ggauuuuagcagagucaaa/aagcccuucagcgcca-3'

Native		AS-7	
sense 5'- GCAGAGUCAAAGCCCUUTT-3'		sense 5'- GCAGAGUCAAAGCCCUUTT-3'	
Antisense 3'- TTCGUCUCAAGUUUCGGGAA -5'		Antisense 3'- TTCGUCUCAAGUUUCGGGAA -5'	
S-7		AS-8	
sense 5'- GCAGAGT*UCAAAGCCCUUTT-3'		sense 5'- GCAGAGUCAAAGCCCUUTT-3'	
Antisense 3'- TTCGUCUCAAGUUUCGGGAA -5'		Antisense 3'- TTCGUCUCAAGUUT*UCGGGAA -5'	
S-8		AS-9	
sense 5'- GCAGAGUT*CAAAAGCCCUUTT-3'		sense 5'- GCAGAGUCAAAGCCCUUTT-3'	
Antisense 3'- TTCGUCUCAAGUUUCGGGAA -5'		Antisense 3'- TTCGUCUCAAGT*UUCGGGAA -5'	
S-18		AS-10	
sense 5'- GCAGAGUCAAAGCCCT*UTT-3'		sense 5'- GCAGAGUCAAAGCCCUUTT-3'	
Antisense 3'- TTCGUCUCAAGUUUCGGGAA -5'		Antisense 3'- TTCGUCUCAAGT*UUCGGGAA -5'	
S-19		AS-15	
sense 5'- GCAGAGUCAAAGCCCU*TT-3'		sense 5'- GCAGAGUCAAAGCCCUUTT-3'	
Antisense 3'- TTCGUCUCAAGUUUCGGGAA -5'		Antisense 3'- TTCGUCT*CAAGUUUCGGGAA -5'	
		AS-17	
		sense 5'- GCAGAGUCAAAGCCCUUTT-3'	
		Antisense 3'- TTCGT*CUCAAGUUUCGGGAA -5'	

Figure 10. BCR/ABL mRNA (355-390)の標的配列とsiRNAの配列

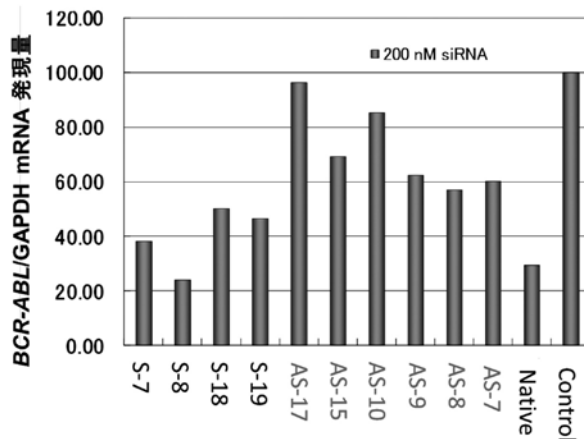


Figure 11. T*を組み込んだsiRNAのサイレンシング効果

組み込んだ10種類のsiRNAを合成し (Figure 9)、そのサイレンシング効果を測定した。

その結果を **Figure 11** に示した。ガイド鎖 (アンチセンス鎖) 7番-10番 (**a7, a8, a9, a10**)、15番 (**a15**)、17番 (**a17**) に修飾塩基を組み込んだsiRNAのサイレンシング効果が30% - 65%大きく低下した。特に、10番 (**a10**)、17番 (**a17**) に修飾塩基を組み込むとサイレンシング効果がほとんど観測されなかった。パッセンジャー鎖 (センス鎖) の7番 (**s7**)、18番 (**s18**)、19番 (**s19**) に修飾塩基を組み込んだ場合には比較的サイレンシング効果の低下が小さく、8-20%であった。唯一パッセンジャー鎖の8番 (**s8**) に組み込んだ場合にだけ、サイレンシングの効果が低下しなかった。

ガイド鎖修飾のサイレンシング効果への影響

Ago2の結晶X線回折の結果⁶⁾ ではガイド鎖7番目 (**a7**) の2'-水酸基はAgo2のA221の主鎖Ago2と水素結合を形成しており、また、ヘリックス7中のイソロイシン365が6番目 (**a6**) と7番目 (**a7**) の間に割り込んで、大きな折れ曲

がりを生じさせていることがわかっている⁶⁾。7番目 (**a7**) の2'-水酸基がないことやガイド鎖7番目 (**a7**) の5'-置換基がヘリックス7中のイソロイシン365と立体的にぶつかり合って、RISCを不安定化したためかもしれない。

ガイド鎖8番目 (**a8**)、9番目 (**a9**) にT*を組み込んだsiRNA (**AS-8, AS-9**) ではサイレンシング効果がそれぞれ43%、38%に低下した。X線結晶構造によれば**a7, a8, a9**の塩基どうしはお互いにスタックおり、Ago2のL1のS220およびL2のR357、PIWIドメイン中のR714とR761が**a7, a8, a9**のリン酸基と相互作用している。また、R710が**a9**と**a10**の間に割って入り、**a9**にスタックしている⁶⁾。従って、**a8**のC5位の置換基がAgo2のHelix-7中のM364と立体的に妨害し、**a9**のC5の置換基がAgo2のArg710のスタッキングを妨害している可能性がある。(Figure 13)

ガイド鎖10番目 (**a10**) にT*を組み込んだsiRNA (**AS-10**) ではサイレンシング効率は15%と大きく低下した。X線結

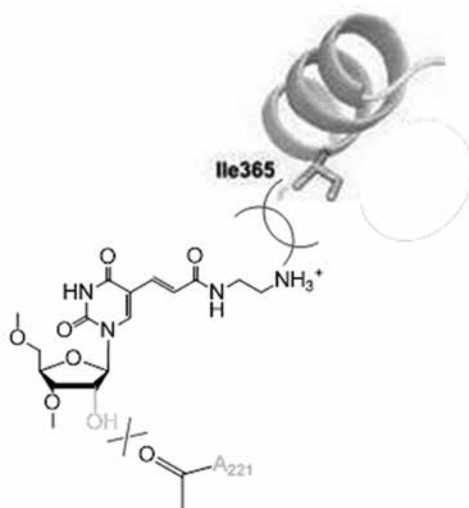


Figure 12. ガイド鎖7番目の5'-置換基とAgo2ヘリックス7中のIle365の相互作用

晶構造によれば Arg710と Arg635が **a9** と **a10** の間に割って入りガイド鎖に大きなよじれを生じさせ、R710が **a9** の塩基と、R635が **a10** の塩基とそれぞれスタックしていることが示されている⁶⁾。A-10T*塩基のC5位置換基がR635と相互作用して、**a9** と **a10** の間よじれに影響を与えた可能性がある。(Figure 13)

ガイド鎖15番目 (**a15**) にT*を組み込んだsiRNA (AS-15) ではサイレンシング効率は30%に低下した。X線結晶構造によればプロリンナックル (Pro67) が **a14** と **a15** の間に割って入って **a14** の塩基をフリップアウトさせて、その上に Arg276がスタックしていることが示されている⁶⁾ (Figure 14)。a15T*のC5位置換基がプロリンナックルの接近を妨害

して、ガイド鎖の構造に変化をもたらした可能性が考えられる。

ガイド鎖17番目 (**a17**) にT*を組み込んだsiRNA (AS-17) ではサイレンシング効率は5%と劇的に低下した。X線結晶構造によれば **a17**、**a18**、**a19** はいずれもスタックしておらず、**a17** と **a18** の間には大きなターンがあることが示されている⁶⁾。a17T*のC5位置換基がこのターン構造に影響を与えた結果、このようなサイレンシング効果の低下を招いた可能性がある (Figure 15)。

パッセンジャー鎖修飾のサイレンシング効果への影響

パッセンジャー鎖 (センス鎖) 7番目 (**s7**) にT*を組み

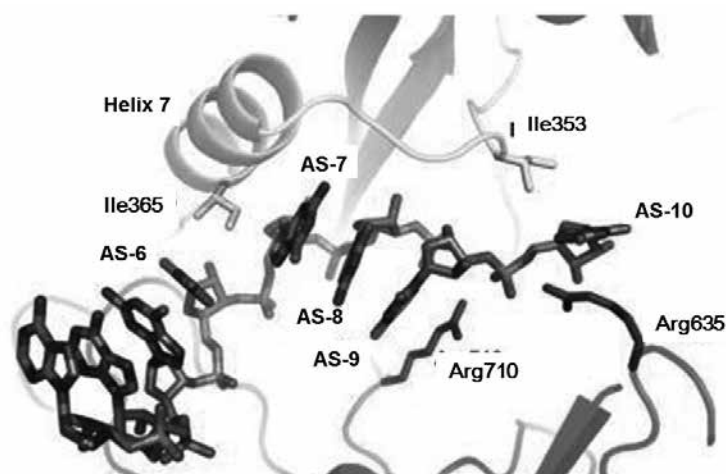


Figure 13. AS-7, AS-9, AS-10とAgo2との相互作用

Protein Data Bank Japan (<https://pdj.org/mine/summary/4f3t>) より改変

入れたsiRNA **S-7**のサイレンシング効果は63%であり、未修飾siRNA (native)と比較してわずかに減少しただけであった。X線結晶構造によれば、hAgo2のNドメインP67プロリナックルが**a13**と**a14**の間に割って入り、**a14**の塩基をフリップアウトさせている。また、Arg278が**a14**にスタッキングし、カチオン- π 相互作用により安定化している。その結果、N-ドメインがくさびの役割をして2本鎖siRNAのアンワインディングを引き起こし、成熟したRISC形成を促すと考えられている。**s7**の位置はガイド鎖13番目 (**a13**)の向かい側に当たり、P67プロリナックルと衝突する可能性もあり、2本鎖siRNAのアンワインディングに影響することも考えられるが、実際には**s7T***のC5位置換基の立体障害は小さいと考えられる。あるいは、P67プロリナックルによる大きなねじれは、アンワインディングの後に1本鎖化されてから生じるものなのかもしれない (**Figure14**)。

パッセンジャー鎖 (センス鎖) 8番目 (**s8**)に**T***を組み入れたsiRNA **S-8**のサイレンシング効果は75%で未修飾siRNAの70%からわずかながら向上した。**s8**はパッセンジャー鎖が切断される**s9**と**s10**に隣接する位置にあり、ガイド鎖**a10**と**a11**の向かい側に当たるため、**s8T***のC5位の置換基がPIWIドメインによるパッセンジャー鎖の切断に影響を与える可能性も考えられる。しかしながら、実際にはその影響は小さいと言える。 (**Figure16**)

パッセンジャー鎖 (センス鎖) 18番目 (**s18**)および19番目 (**s19**)に**T***を組み入れたsiRNA **S-18**およびsiRNA **S-19**のサイレンシング効果はそれぞれ50%、55%であり、いずれも未修飾siRNAの70%より低下した。パッセンジャー鎖**s18**、**s19**はガイド鎖**a1**、**a2**の向かい側に位置する。X線結晶構造によれば、**a1**と**s19**は塩基対を形成しておらず、**a1**の塩基はフリップアウトし、5'-リン酸基がMidドメインとPIWIドメインの境界にあるカチオン性ポ

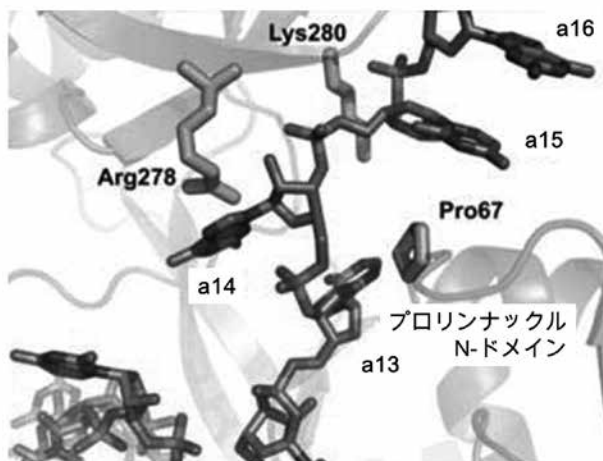


Figure 14. hAgo2のプロリナックル (Pro67) とa15T*のC5位置換基の立体障害
Protein Data Bank Japan (<https://pdbj.org/mine/summary/4f3t>) より改変

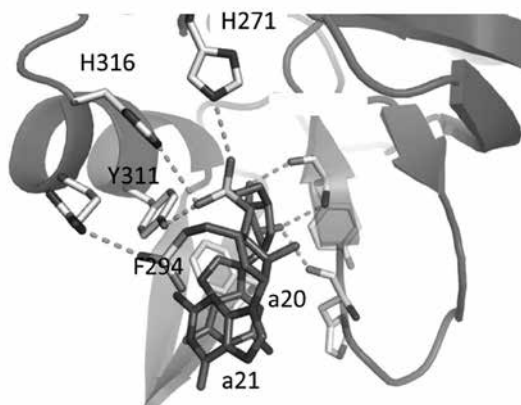


Figure 15. hAgo2のNドメインとa17~a21の相互作用
Protein Data Bank Japan (<https://pdbj.org/mine/summary/4f3t>) より改変

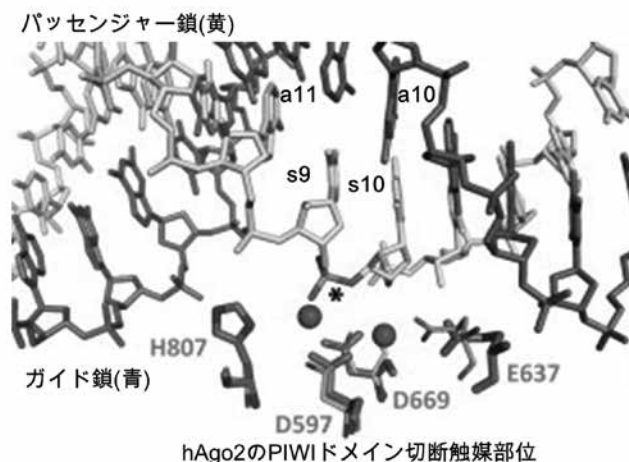


Figure 16. hAgo2のPIWIドメイン切断触媒部位とsiRNAの近傍構造

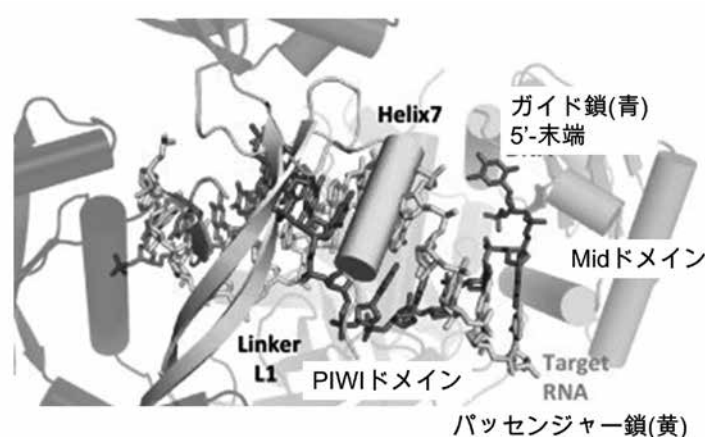
Protein Data Bank Japan (<https://pdj.org/mine/summary/4f3t>) より改変

Figure 17. hAgo2と2本鎖siRNAガイド鎖5'-末端近傍の構造

Protein Data Bank Japan (<https://pdj.org/mine/summary/4f3t>) より改変

ケットに深く入り込んでいる⁶⁾ (Figure 17)

結論

以上の結果を Figure 18 にまとめた。一般的には、ガイド鎖（アンチセンス鎖）のUをT*に置換した場合にはサイレンシング効果が大きく低下し、パッセンジャー鎖（センス鎖）のUをT*に置換した場合のサイレンシング効果への影響は比較的小さかった。T*をガイド鎖a7、a8、a9、a10、a15、a17に組み入れた場合には未修飾siRNAに比べてサイレンシング効果が30~65%低下した。とりわけ、a10およびa17に組み入れたAS-10およびAS-17ではほとんどサイレンシング効果が消失した。前述のBeal等の結果ではa1、a3、a6、a10、a18のメジャーグループ修飾によりサイレンシング効果の低下が観測されたが、今回の結果はそれとよく一致している。一方で、パッセンジャー鎖

s7、s18、s19のUをT*に置換した場合には未修飾siRNAに比べてサイレンシング効果が8%~20%低下したが、その低下の程度はガイド鎖のUを置換した場合よりかなり小さかった。また、パッセンジャー鎖s8のUをT*に置換した場合には未修飾siRNAに比べてサイレンシング効果が低下しなかったことは興味深い。上述のとおり、パッセンジャー鎖s8は切断部位s9 - s10に隣接した位置であるが、hAgo2のPIWIドメインの触媒活性部位は2本鎖siRNAのマイナーグループから接近するために、メジャーグループ側のC5位の置換基には影響を受けない可能性がある。

謝辞

この研究の一部は日本学術振興機構科学研究費補助金基盤研究(C) 25410182および近畿大学学内研究助成金KDIIにより補助されています。

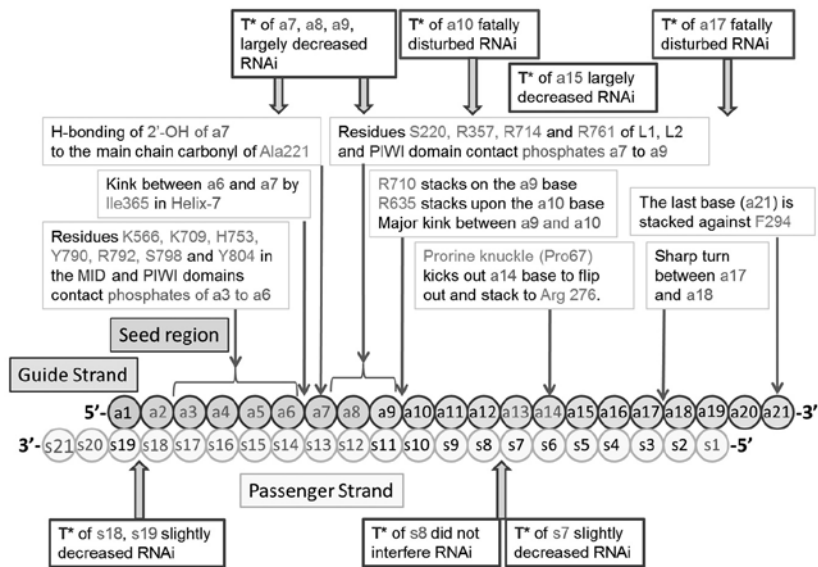


Figure 18. hAgo2の結晶構造とsiRNAの化学修飾によるサイレンシング効果への影響

参考文献

- 1) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C., *Nature* **1998**, 391 (6669): 806-811.
- 2) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T., *Nature*, **2001**, 411 (6836): 494-498.
- 3) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Richard W. Carthew, Erik J. Sontheimer, *Cell*, **2009**, 136(4), 642-655.
- 4) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA, Gunter Meister & Thomas Tuschl, *Nature*, **2004**, 431, 343-349.
- 5) siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. Carl D. Novina, Michael F. Murray, Derek M. Dykxhoorn, Paul J. Beresford, Jonathan Riess, Sang-Kyung Lee, Ronald G. Collman, Judy Lieberman, Premlata Shankar & Phillip A. Sharp, *Nature Medicine*, **2002**, 8, 681-686.
- 6) The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. Elad Elkayam, Claus-D. Kuhn, Ante Tocilj, Astrid D. Haase, Emily M. Greene, Gregory J. Hannon, Leemor Joshua-Tor, The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell*. **2012** July 6; 150(1): 100-110.
- 7) Interactions between the non-seed region of siRNA and RNA-binding RLC/RISC proteins, Ago and TRBP, in mammalian cells. Takahashi T, Zenno S, Ishibashi O, Takizawa T, Saigo K, Ui-Tei K. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42(8), 5256-5269.
- 8) Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. Ui-Tei K, Naito Y, Zenno S, Nishi K, Yamato K, Takahashi F, Juni A, Saigo K., *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36(7), 2136-2151.
- 9) 7-Substituted 8-aza-7-deazaadenosines for modification of the siRNA major groove. Ibarra-Soza JM, Morris AA, Jayalath P, Peacock H, Conrad WE, Donald MB, Kurth MJ, Beal PA., *Org Biomol Chem.* **2012**, 10(32), 6491-6497.
- 10) Minor-groove-modulating adenosine replacements control protein binding and RNAi activity in siRNAs. Peacock H, Fostvedt E, Beal PA. *ACS Chem Biol.* **2010**, 5 (12), 1115-1124.