

# 遺伝子診断システムの開発

## —ランダムスクリーニング法による遺伝子増幅反応の最適化—

田 谷 敏 貴  
 斉 藤 寿 一  
 林 俊 典  
 石 黒 敬 彦

### Development of a Novel Genetic Diagnosis System —Optimization of the Nucleic Acid Amplification Reaction by the Random Screening Method—

Toshiki TAYA  
 Juichi SAITOH  
 Toshinori HAYASHI  
 Takahiko ISHIGURO

We are successful in predicting the preferable priming sites for hepatitis C virus (HCV) RNA by the random screening method. We have also developed the isothermal nucleic acid amplification method based on the transcription-reverse transcription concerted (TRC) amplification reaction, which allows to amplify only the RNA fragments trimmed by a scissor probe. The results obtained by the random screening method are applied to design the sequences of scissor probes and anti-sense primers for TRC amplification. Finally, we have demonstrated the homogeneous real-time detection of HCV RNA fragments produced during the TRC amplification with intercalation activating fluorescence (INAF) probe in an unopened vessel. The present method is quantitative for the detection of HCV RNA in clinical samples.

#### 1. 緒 言

遺伝子診断は、感染症における初期のスクリーニングや治療効果の観察などの目的で臨床検査で広く行われるようになってきている。一方、癌についても多くの癌遺伝子や癌抑制遺伝子が見つかることから、遺伝子診断への期待は急速に高まっている。既に、用手法のキットも出回っているが、多数の検体処理やコンタミネーションを回避する目的で診断システムの一連

の操作を自動化する動きが活発化している。

我々は、自動化システムの要素技術として検出素子および核酸増幅法の両面から独自の基盤技術の構築に注力してきた。その中で既に、標的核酸配列と相補結合を形成することによって顕著な蛍光増感を与える、B/F分離不要なDNAプローブ（発蛍光プローブ：INAF probe）を開発し、これを用いてインビトロ転写反応で生成したRNAを配列特異的に検出する方法を構築した<sup>1)</sup>。

しかし、発蛍光プローブを遺伝子診断システムに適用するには、鋳型核酸の初期コピー数をインビトロ転写反応で検出できるレベルにまであらかじめ増幅しておく必要がある。このために、これまでは急激な昇温と降温を必要とするRT-PCR法に頼らざるをえなかった。最近我々は、一定温度で増幅可能な独自のRNA増幅法（転写・逆転写協奏増幅法：TRC法）を開発することで、発蛍光プローブとTRC法との組み合わせによる遺伝子診断システムを開発するに至った<sup>2)</sup>。

核酸の増幅には、プライマーと呼ばれるDNAオリゴマーを標的核酸に結合させる必要がある。しかし、一定温度の核酸増幅において有効なプライマー設計の方法はこれまで知られていなかった。

通常、RNAは4種類の塩基を並べた一本のポリリボヌクレオチド鎖として表されるが、実際の溶液中では分子内で塩基対どうしの相補結合を作り、さらに立体的に折りたたまって複雑な構造を取っている。この立体構造中には、分子内結合（二重鎖）領域と分子内結合フリー（一重鎖）領域が存在する。そこで、分子内結合フリー領域には相補的なDNAオリゴマー、すなわちプライマーが効率良く結合して、安定なRNA-DNA二重鎖を作ると考えられる。そこで我々は、この現象を利用して高次構造フリーの領域を実験的に決定するランダムスクリーニング法を考案するに至った。この結果をもとにして、標的RNAを一旦ほぐしてプライマーと結合するディネーチャ・アニーリング操作の不要な、一定温度で結合可能なプライマーを設計できる。我々はこのような観点から、TRC反応効率の向上ならびに一チューブ・一定温度測定プロトコルの具体化をねらった。

本稿では、HCV RNAへの適応を例にランダムスクリーニング法によるTRC反応の最適化、発蛍光プローブを組み合わせた迅速・高感度リアルタイムモニタリング測定構築、およびその臨床応用として血清サンプル中のHCV RNAのホモジニアス定量に関して紹介する。

## 2. 材料および方法

### [1] 材料の調製

#### (1) 標的核酸

1549塩基長のC型肝炎ウイルス（HCV）RNA標準試料（HCV cDNA塩基番号1～1487を含む）は、文献3に従って調製した。

#### (2) 臨床検体

慢性C型肝炎患者血清は、京都大学医療短期大学部、福田善弘教授より提供を受けた。その血清（ $9.6 \times 10^5$  コピー/ $100 \mu\text{l}$ ）をHCV抗体陰性血清（SCANTIBO DIESLAB. INC.）によって希釈し血清希釈列とした。

#### (3) ランダムプライマー

ランダムな塩基配列を持つ6塩基長のDNA鎖（d(N)<sub>6</sub>）を宝酒造株式会社より購入した。

#### (4) 高次構造フリー領域確認用のDNAオリゴマー候補

20塩基長のDNAオリゴマー候補を宝酒造株式会社依頼合成した。

#### (5) プローブ

切断プローブ候補は、3'末端をアミノ基で修飾した20～50塩基長のDNA鎖である。HCV cDNA塩基番号71～120<sup>4)</sup>に相補的な配列の一部を含む。これらは宝酒造株式会社に依頼合成した。

発蛍光プローブは、3'末端をグリコール酸で修飾した13塩基長のDNA鎖であり、オキサゾールイユロー（YO）がDNA鎖の内部の一つのリン酸ジエステル結合にリンカーを介して修飾された構造を持つ<sup>5)</sup>。ここでは、YO-271-g:5'-CTCGC\*GGGGGCTG-3'を調製した（\*はYO修飾位置、gはグリコール酸を示す）。YO-271-gは1～11番目の塩基がHCV cDNA塩基番号223～233に相補的である。

#### (6) プライマー

アンチセンスプライマー候補は、HCV cDNA塩基番号228～267に相補的な配列の一部を含む18～20塩基長のDNA鎖である。これらは宝酒造株式会社に依頼合成した。

SP6プロモータ・プライマー候補は、SP6プロモータ配列（5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATACAA）の下流に隣接してHCV cDNA塩基番号101～137の配列の一部を含む50塩基長のDNA鎖である。これらは宝酒造株式会社に依頼合成した。

### [2] ランダムスクリーニング法によるRNAの高次構造フリー領域の解析

ラジオアイソトープ（ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ）を用いて5'末端を修飾した1.5k HCV RNA標準試料を調製した。このRNA標準試料（1.2pmol/assay）にランダムプライマー（7.5pmol/assay）と0.1U/assayのRNaseHを加えて37℃でインキュベートした（反応条件は文献6）。5～15分後に7M尿素により反応を停止した。これらの溶液を7M尿素-5%ポリアクリルアミドゲ

ルにて電気泳動を行い、オートラジオグラフを撮影した。切断断片の長さは、同時に展開した数種類の分子量既知のRNA/DNAマーカーから計算した。

1.5k HCV RNA標準試料の2次構造(37℃)は、計算機プログラム'MFold ver2.3'(文献7)により推定した。

### [3] 切断プローブ候補のスクリーニング

未標識の1.5k HCV RNA標準試量(1.2pmol/assay)と切断プローブ候補の存在下、42U/assayのAMV逆転写酵素を加えて37℃または50℃で15分インキュベートした。反応条件はTRC増幅の条件とした。その溶液を7M尿素-6%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、SYBR Green IIにより染色した。

### [4] TRC蛍光モニタリングによるHCV RNAの検体

#### (1) プロモータ・プライマー候補のスクリーニング

TRC増幅を行った後、増幅後のサンプルを4%アガロースゲルにて電気泳動し、SYBR<sup>TM</sup>Green IIにより染色した。

#### (2) アンチセンスプライマー配列の微調整

プライマー解析ソフト'Oligo ver4.01'(National Biosciences, Inc.)により、プライマー・ダイマーのエネルギー計算を行った。

#### (3) TRC増幅

120mM Tris酢酸(pH8.2)、240mM酢酸カリウム、26.6mM酢酸マグネシウム、32%ソルビトール、1.5mM dNTPs、1.5mM NTPs、2mM ITP、20mM DTT、2U/ $\mu$ l RNase inhibitor(宝酒造株式会社)、0.4 $\mu$ Mプライマーセットを含む溶液を試薬ミックス溶液とした。4.2U/ $\mu$ l AMV逆転写酵素(LIFE TECHNOLOGIES, INC.)、17U/ $\mu$ l SP6 RNAポリメラーゼ(宝酒造株式会社)、0.03%BSA(宝酒造株式会社)を含む溶液を酵素ミックス溶液とした。試薬ミックス溶液15 $\mu$ lをPCR用チューブに分注し、試料5 $\mu$ lを添加した。50℃にて5分間プレインキュベーションを行い、酵素ミックス溶液を10 $\mu$ l添加した後、50℃で90~120分間TRC増幅反応を行った。

#### (4) リアルタイムモニタリング

試薬ミックスにあらかじめ0.8 $\mu$ Mの切断プローブ('B+20-30-NH<sub>2</sub>';本文中で説明)および50nMの発蛍光プローブ(YO-271-g)を添加した。開発中の試作装置(Fig. 5)によってTRC増幅に伴う蛍光強度を測定し、5分間隔で蛍光強度をサンプリングした。

#### (5) 核酸抽出

血清希釈液100 $\mu$ lより、核酸抽出キット「Sepagene」

(三光純薬株式会社)を用いて核酸抽出を行い、10mM Tris·HCl(pH8.0)、0.1mM EDTA、5mM DTT、0.5U/ $\mu$ l RNase Inhibitorを含む検体希釈液6 $\mu$ lによって溶解し、この5 $\mu$ lを試料とした。

## 3. 結果および考察

### [1] ランダムスクリーニング法によるRNAの高次構造フリー領域の解析

ランダムスクリーニング法では2つの試薬、ランダムプライマーと酵素RNaseHを用いる。ランダムプライマーとしては、4096種類の配列を含むランダムな配列を持った6塩基長のDNAオリゴマーを用いた。一方、RNaseHはRNA-DNA二重鎖を認識し、認識されたRNAのみを分解するRNA分解酵素である。そこで、標的RNAの溶液にランダムプライマーを加え、分子内結合フリー領域に相補的なDNAオリゴマーを結合させる。これにRNaseHを加えると、DNAオリゴマーが結合した領域でそのRNA部分が切断される。我々は、その切断された断片の長さから分子内結合フリー領域が解析できると考えた。

実際の1.5k HCV RNA標準試料の分子内結合フリー領域の推定では、あらかじめRNAの5'末端をラジオアイソトープ標識した。Fig. 1Aに電気泳動後のオートラジオグラフを示した。ランダムプライマーとRNaseHの両方が存在する時のみ数種の切断断片の生

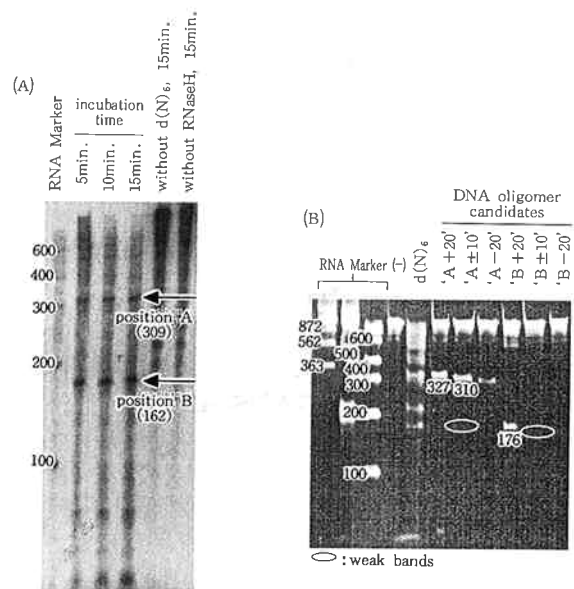


Fig. 1 Analysis of RNaseH cleavage sites for 1549 mer HCV RNA by random screening method.

成が観察された。これらの切断断片長の長さから、分子内結合フリー領域の5'末端からの距離を知ることができると考えられる。特に、観察された切断断片のうち、インキュベーション時間と切断断片の黒化度に差が見られない309塩基長と162塩基長の濃いバンド(図中矢印)については、RNAの5'末端から309番目(位置A)付近と162番目(位置B)付近にDNAオリゴマーが強く結合する領域が存在することを示していると考えた。

そこで次に、推定された2か所の領域に対し、それらの領域に対して相補的な配列を持つ20塩基長のDNAオリゴマーと1.5k HCV RNA標準試料の混合溶液にRNaseHを加え、その領域で切断が起こるか確認実験を行った。実際にはDNAオリゴマーは推定領域ごとに3種類のDNAオリゴマー候補を定めた。例えば位置Aでは、RNAの3'末端に向かって20塩基の相補配列('A+20')、位置Aを中心に20塩基の相補配列('A±10')、位置AからRNAの5'末端に向かって20塩基の相補配列('A-20')とした。位置Bについても同様とした。Fig. 1 Bに電気泳動後の染色結果を示した。その結果、位置Aに対応する3種類のDNAオリゴマーは、いずれもランダムスクリーニング法で推定された309番目付近に対応する切断バンドが観察された。一方、位置Bに対応する3種類のDNAオリゴマーについては、2種類のDNAオリゴマーに対してランダムスクリーニング法で推定された162番目付近に対応する切断バンドが観察された。従って、ランダムスクリーニング法で推定した2か所の領域付近には、高次構造フリー領域が存在することが確認された。

RNAの立体構造をNMRなどの構造解析によって決定する試みがなされているが、現状では数十塩基長のRNAに限られている。一方、RNAの立体構造を計算機化学により推定する試みは成功していない。今回、1.5k HCV RNA標準試料についてRNAの2次構造推定を計算機により行った。推定構造のうち1~365番目の領域についてFig. 2に示した。この中で、5塩基以上の一本鎖領域について小矢印で、またランダムスクリーニング法で推定された位置を大矢印で示した。さらに、前述の確認実験で切断断片が観察されたDNAオリゴマーのうち、黒化度の大きい3種のDNAオリゴマー('A+20', 'A±10', 'B+20'; Fig. 1 B)に対応する領域についても併せて示した。これより、確認実験で標的RNAに特に強く結合したことが

確認された3種のDNAオリゴマーに対応するRNAの領域は、全て小矢印、即ち計算機により推定した5塩基以上の一本鎖領域(321-326, 302-306, 170-176)を含むことが分かった。このことは、2次構造予測の精度が高いことを示している。しかしながら、計算機による2次構造予測では非常に多くの分子内結合フリー領域が推定され、またRNA-DNA二重鎖の安定性の正確な順位付けは極めて困難である。

## [2] ランダムスクリーニング法の定温核酸増幅におけるプライマー・プローブ設計への応用

我々は次に、ランダムスクリーニング法による高次構造フリー領域の解析結果に基づいて、TRC増幅におけるプライマー・プローブ設計を試みた。

我々が開発したTRC増幅法を用いたRNA検出の原理をFig. 3に示す。特定の配列を有するRNAの検体は、切断プローブによる標的核酸の反応前切断工程、TRC増幅工程、発蛍光プローブによる増幅RNAの検出工程の計3工程からなる。

TRC増幅法(Fig. 3中の増幅エンジン)とは、転写反応と逆転写反応をいわば協調的に作用させることで核酸を増幅する方法である。アンチセンスプライマーの存在下、逆転写酵素によりRNAからDNAが合成され、さらにプロモータ・プライマーの存在下、プロモータの具備した二重鎖DNAが合成される。次に、RNAポリメラーゼと呼ばれる転写酵素により二重鎖DNAからRNAが合成される。ここで合成されたRNAは再

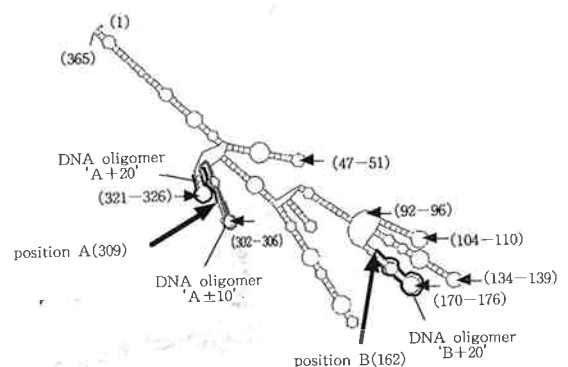


Fig. 2 Computational secondary structure model and experimental RNaseH cleavage sites mapping for 1549 mer HCV RNA (positions 1-365).

Small arrows,  $\geq 5$  base single-stranded RNA regions predicted in a computer program;  
Large arrows, 5'-terminal sites of RNA cleaved regions predicted by random screening method.

び逆転写酵素の作用を受ける。このようにして、転写反応と逆転写反応が競争的に作用することにより、RNAが増幅・生産されていく。この増幅サイクルは、2つの酵素の至適温度付近である40~50℃の範囲内の一定温度で進行する。これは、従来の急激な昇温と降温を必要とするPCR法と決定的に異なる点であり、TRC法は自動化が容易な一定温度での核酸増幅法であると考えられる。

我々は今回、TRC増幅工程におけるアンチセンスプライマーの設計と反応前切断工程における切断プローブの設計に対してランダムスクリーニングの結果を応用した。

核酸を増幅する場合には、まずプライマーを結合させる必要がある。しかしながら、RNAが分子内で結合している領域にはそのままではプライマーは結合できない。これを解決するには、一般的にはPCR法のように温度を上げて、標的核酸をほぐす手段が取られる。そこで我々は、ランダムスクリーニング法で解析した分子内結合フリーの領域に対するプライマーを用いれば、熱変性なしでプライマーが効率よく標的RNAに結合できると考えた。そこで、アンチセンスプライマーについては、ランダムスクリーニング法の確認実験で標的RNAに強く結合したことが確認されたDNAオリゴマー'A+20'をそのまま用いることにした。

次に切断プローブについては、TRC増幅法の場合にはあらかじめプロモータ・プライマーが結合する領域で標的核酸を切断しておく必要があり、そのために、

切断プローブを標的核酸に結合させランダムスクリーニング法のようにRNaseHで切断する方法が考えられる。ここでは、RNaseHとしてTRC増幅で用いるAMV逆転写酵素で代用可能なことを確認した。この切断プローブを標的核酸に結合させるために、やはりランダムスクリーニング法で解析した分子内結合フリーの領域に対するDNAオリゴマーを用いれば、熱変性なくとも切断プローブが効率よく結合できると考えた。さらに、熱変性なしで切断から増幅までを一定温度で一貫して行うことが出来ることを期待した。そこで、ランダムスクリーニング法の確認実験で標的RNAに強く結合したことが確認されたDNAオリゴマー'B+20'を用いて、50℃/10分で切断を試みたところ、37℃よりも切断活性の若干の低下が認められた。別の実験で、AMV逆転写酵素は50℃でも十分なRNaseH活性を持つことが確認できたことから、若干の活性の低下は、DNAオリゴマーの結合が50℃で弱まっているためと考えた。一般に、核酸どうしの安定性はその長さに依存することが知られている。そこで、DNAオリゴマー'B+20'の3'末端を数十塩基伸ばすことで、安定なRNA-DNA二重鎖を形成させ、AMV逆転写酵素のRNaseH活性によって効率よく切断できると考えた。その場合、長鎖のDNAオリゴマーが'B+20'の相補領域を起点にしてRNAの分子内結合領域をほどいていくことを期待した。実際に、DNAオリゴマー'B+20-NH<sub>2</sub>'、'B+20'の3'末端を10塩基伸ばした'B+20-10-NH<sub>2</sub>'、'B+20'の3'末端を20塩基伸ばした'B+20-20-NH<sub>2</sub>'および'B+20'の3'末端を30塩基伸ばした'B+20-30-NH<sub>2</sub>'を用いて切断実験を行った。電気泳動後の染色結果をFig. 4 Aに示す。全ての場合において同様な黒化度の切断断片が観察された。従って、全ての切断プローブ候補が標的核酸の対応する領域に結合したと考えられる。また、3'末端を伸ばすに従って切断断片が短くなっていることから、伸ばした部分でもRNA-DNA二重鎖が形成されたことが示された。反応時間を短くすれば、より鎖長の短い切断プローブ候補では見かけの切断活性は弱まると考えられる。さらにまた、最も塩基長の長い'B+20-30-NH<sub>2</sub>'の場合にはFig. 2の2次構造における170-176の分子内結合フリー領域だけでなく134-139の分子内結合フリー領域の相補配列も含まれることから、この50塩基長のDNAオリゴマーをTRC増幅法を用いたRNA検出に用いる切断プローブとして最も有効であると判断した。

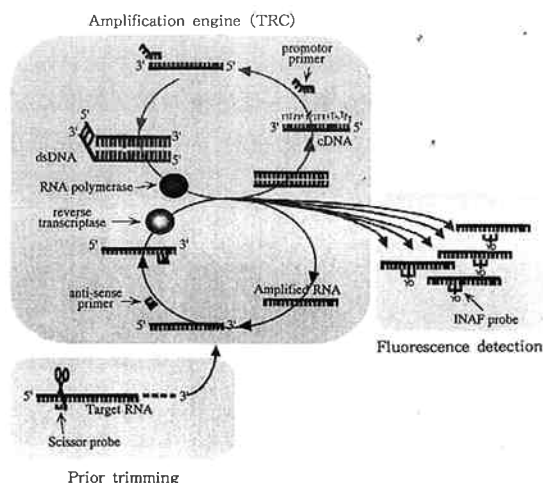


Fig. 3 Principle of three steps to select a specific nucleic acid sequence.

Fig. 4 Bは、この切断プローブを用いて50℃での切断を経時的に行った後の電気泳動の染色結果を示したものである。これより、切断は1分以内に完結することが示された。通常PCRの伸張反応は1~2分かけて行われることから、切断と増幅の場を同時に与えても、伸張反応が切断位置に到達する前に切断が前もって終了していることが期待できる。このことは、システム開発において一段階の試薬添加で済むという点で大きな意義を持つ。

### [3] TRC蛍光モニタリングによるHCV RNAの検出

そこで、切断プローブ'B+20-30-NH<sub>2</sub>'、アンチセンスプライマー'A+20'および発蛍光プローブ等を用いて、ディネーチャ・アニーリング操作なしに切断・TRC増幅・測定までを同時に行うリアルタイム検出法について検討した。

まず、これに先立ちプロモータ・プライマーの選定を行った。SP6プロモータ配列の下流に隣接して、

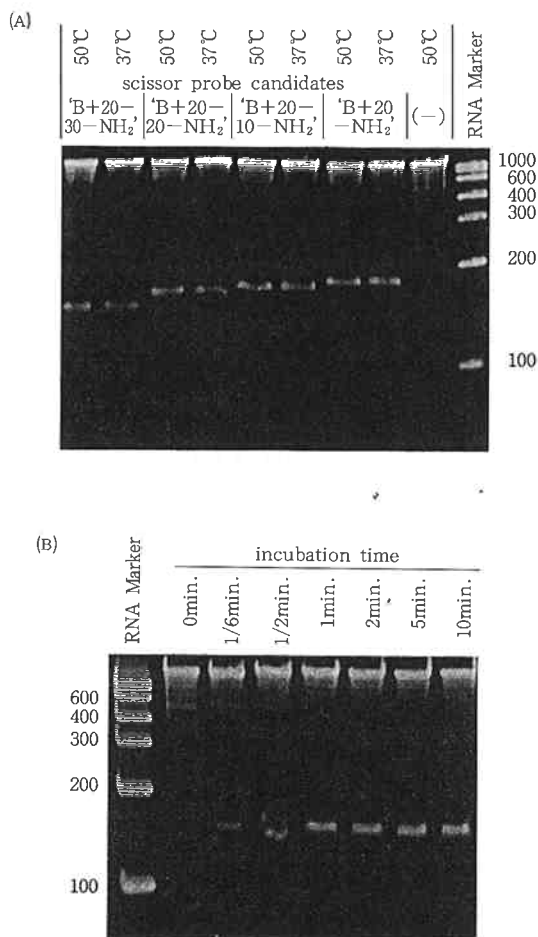


Fig. 4 Analysis of prior trimming by scissor probe for 1549 mer HCV RNA.

切断プローブ'B+20-30-NH<sub>2</sub>'に相補的なRNAの領域の3'側から8塩基ぶん5'側に戻った位置から3'末端に向かって25塩基の配列('SP6-1'), 3'側から13塩基ぶん5'側に戻った位置から3'末端に向かって25塩基の配列('SP6-2'), 3'側から18塩基ぶん5'側に戻った位置から3'末端に向かって25塩基の配列('SP6-3')を定めた。切断プローブと発蛍光プローブ非存在下でTRC増幅を行い、増幅後の電気泳動の特異バンドの黒化度より'SP6-1'を選定した。

次に、アンチセンスプライマー配列の微調整を行った。微調整は3'末端で形成されるプライマー・ダイマーのエネルギーが不安定になるように既存の配列の末端を数塩基削るまたは伸ばすことにより行った。切断プローブと発蛍光プローブの存在下で切断を伴ったTRC増幅のモニタリングを行い、蛍光が検出される時間の早い'A+20-2'('A+20'の3'末端を2塩基削ったもの)を選定した。

リアルタイムモニタリングは開発中の試作装置を用いて行った。Fig. 5に試作装置の全体写真を示した。488nmのアルゴンイオンレーザを光源とし、恒温槽のサンプルホルダに設置されたサンプルチューブの横側から励起光を照射する。そして、サンプルチューブの底部から放射した蛍光をライトガイドで伝達し、干渉フィルター(520nm)で波長選別した後、フォトマルチplierで検出している。TRC増幅に伴って増大する蛍光強度はこのようにしてリアルタイムに測定される。恒温槽のサンプルホルダ部をFig. 5の中に拡大写真で示した。現在はここに一度に32個のサンプル・チューブを装着して同時測定が出来るようになっている。

Fig. 6 Aに、1.5k HCV RNA標準試料(組み換え調製体)でのリアルタイムモニタリングの結果を示した。試料中にHCV RNAが存在しない場合には、120分間のTRC増幅をもっても反応液の蛍光強度には変

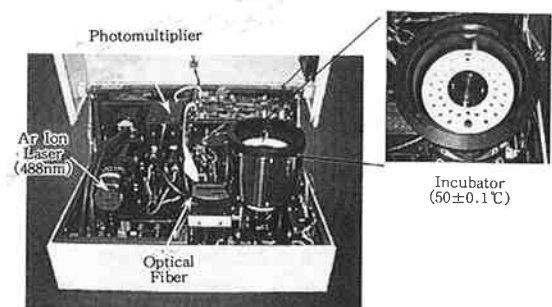


Fig. 5 Experimental TRC monitor instrument.

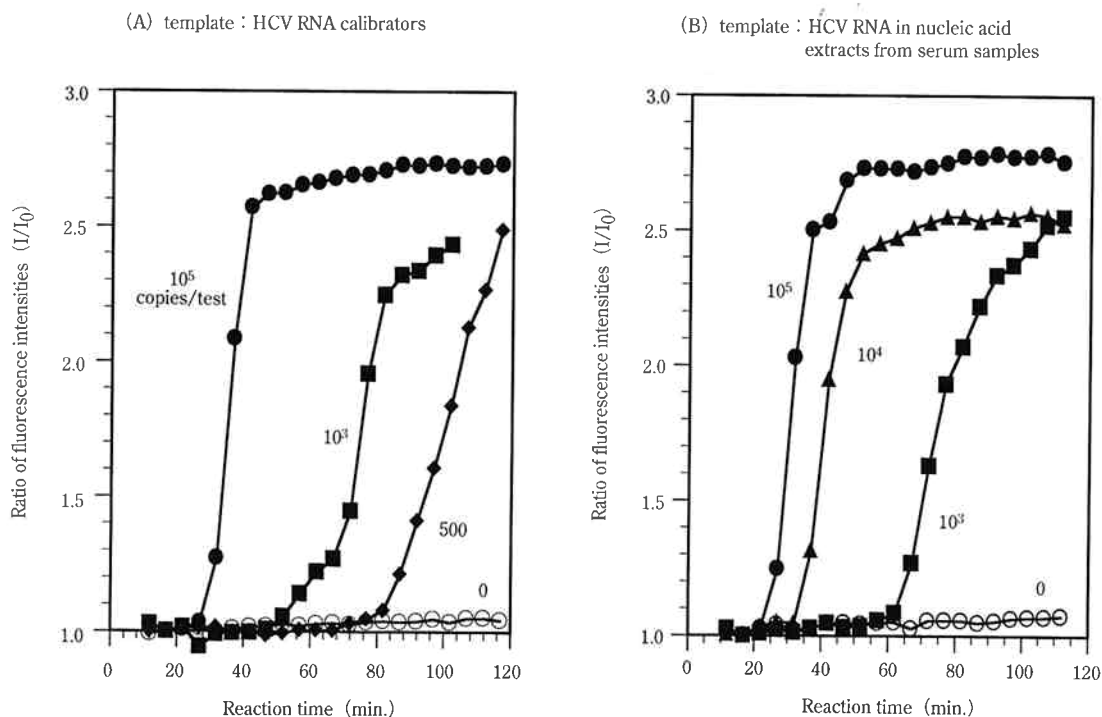


Fig. 6 Real-time monitoring during TRC amplifications from various starting copies.

化が認められなかった。一方、標準RNAが存在した場合には顕著な蛍光強度の増大が認められ、蛍光強度の立ち上がり時間は標準RNAの初期コピー数に依存した。これは、立ち上がり時間から試料中の標的RNAの初期コピー数を定量できることを示している。現在の最適化条件において、50℃での90分のインキュベーションの間に500コピー/テストまでの検出が可能である。

各種濃度の検体でのリアルタイムモニタリングの結果をFig. 6Bに示した。HCV抗体陰性血清から抽出された0コピー/テストの試料の場合には、120分間のTRC増幅をもって反応液の蛍光強度には変化が認められなかった。一方、一定量のHCV RNAが含まれる血清サンプルから抽出された各種濃度の検体の場合には有意な蛍光強度の増大が認められ、蛍光強度の立ち上がり時間は標準RNAの初期コピー数に依存した。しかも、その立ち上がり時間は標準RNAの同コピーの立ち上がりと比べても遜色ないものであった。

本法は、試料に試薬ミックスと酵素ミックスを添加し一チューブ・一定温度での蛍光測定を行い、その蛍光強度の経時的な測定結果から試料中の標的核酸の有無を判定する。したがって、核酸増幅後の分離分析は一切必要とせず、自動化システムに有効な検出方法と考えられる。

#### 4. 結論

ランダムスクリーニング法によって、HCV RNAの分子内結合フリー領域を実験的に決定した。この結果に基づいて、TRC増幅に用いる切断プローブとアンチセンスプライマーの設計を行った。

ランダムスクリーニングに基づいて最適化された切断プローブとアンチセンスプライマーを用いてTRC増幅を行うことで、ディネーチャ・アニーリングの操作なしに一チューブ・一定温度でのHCV RNAのリアルタイムモニタリング検出が可能となった。本法によれば、試料に試薬ミックスと酵素ミックスを添加し、その蛍光強度を測定するだけで標的核酸の初期コピー数を500コピー/テストまで定量することが可能で、自動化システムの構築も容易である。

さらに、HCV RNA陽性患者血清を用いたリアルタイムモニタリング実験では、標準RNAを用いた場合と同様な蛍光プロファイルが得られ、本法が迅速で高感度な検出手段として有効であることが示された。

#### 文献

- 1) 齊藤寿一, 石黒敬彦, 東ソー研究報告, 41, 13-21 (1997)
- 2) T. Taya, et al., *Nucleic Acids Symposium*

- Series. Oxford University Press, 42, 51-52 (1999)
- 3) T. Ishiguro, et al., *Analytical Biochem.*, 229, 207-213 (1995)
- 4) N. Kato, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9524-9528 (1990)
- 5) T. Ishiguro, et al., *Nucleic Acids Res.*, 24, 4992-4997 (1996)
- 6) Birikh, K. R., et al., *RNA*, 3, 429-437 (1997)
- 7) Zuker, M., *Science*, 244, 48-52 (1989)



著者  
氏名 田谷 敏貴  
Toshiki TAYA  
入社 平成6年4月1日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野  
副主任研究員



著者  
氏名 斉藤 寿一  
Juichi SAITO  
入社 昭和62年4月1日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野  
主任研究員



著者  
氏名 林 俊典  
Toshinori HAYASHI  
入社 昭和60年4月1日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野  
主任研究員



著者  
氏名 石黒 敬彦  
Takahiko ISHIGURO  
入社 昭和58年4月1日  
所属 東京研究所  
企画管理G  
主席研究員