

新規蛍光プローブ開発を目指した PNA モノマーの開発

日大工・生命 齋藤 義雄

【序】

ペプチド核酸 PNA (Peptide Nucleic Acid) は 1991 年にニールセンらによってはじめて報告された DNA アナログであり、DNA や RNA の主鎖に見られる電荷を有するリン酸ジエステル結合の代わりにアミド結合を有する非天然のポリマー分子である。DNA や RNA は、主鎖にそれぞれ 2'-デオキシリボースおよびデオキシリボースといった糖構造を有するのに対して、PNA ではそれらの糖に代わって、*N*-(2-アミノエチル)グリシンが用いられている。また、PNA は通常アデニン A、グアニン G、チミン T、シトシン C などの DNA と類似の塩基部位を有しており、DNA と同様に相補的な配列を有する PNA や DNA、RNA とハイブリダイズして二重鎖を形成することが可能である。

任意の配列を有する 20mer 程度の短い DNA や RNA は、DNA/RNA 自動合成機を用いることで数時間程度で合成することが可能である。一方、ペプチド構造を有する PNA の場合は、ペプチド合成機を用いることで、同様に短い配列であれば一晩程度で合成することが可能である（さらに、DNA などに比べて大きいスケールでの合成が可能である）。天然の DNA や RNA は生体内においてヌクレアーゼなどの酵素によって容易に分解されてしまうためプローブを作成する際には、酵素分解されないような工夫を施す必要があるが、もともと非天然の構造を有する PNA は、ヌクレアーゼやプロテアーゼといった酵素に耐性であるため、そのような心配は不要である。そのため細胞に対して用いるプローブとして応用しやす

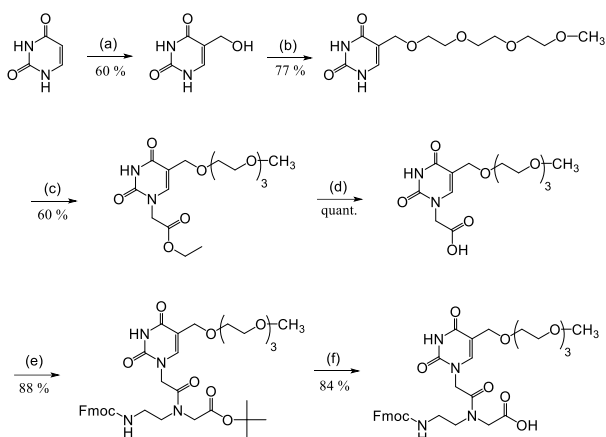
いといった利点がある。また、先ほど述べたように、PNA には DNA や RNA に存在するようなリン酸部位の電荷が存在しないため、相補鎖とハイブリダイズする際の安定性に対する塩濃度の影響が少ないということが知られている。さらには、リン酸部位の負電荷が存在しないために静電反発の影響が小さく、PNA/DNA の 2 重鎖は DNA/DNA の 2 重鎖よりも強い結合を形成することが知られている。このようなことから、修飾 PNA のオリゴマーは、プローブとして病気の診断やアンチセンス療法等への応用が期待されている。

このように、良い事ばかりに見える PNA であるが、実際にプローブとして利用しようと考えると、いくつかの問題点があることが知られている。その代表的なものの一つとして、溶解性の悪さが挙げられる。PNA は、その非イオン性の構造のために、水溶液中で凝集してしまい溶解性が低下してしまうことがしばしば見られる。また、それに伴って同様の理由により細胞膜透過性も低下し、細胞への導入が困難なケースもしばしば見受けられる。そのため、本研究では PNA に親水性置換基を導入した新規 PNA モノマーを合成し、それを導入した PNA 鎖を作成して、その特性、特に細胞膜透過性についての評価を行うこととした。また、これらと同時に開発を進めている蛍光核酸プローブに関しての発表も行う予定である。

【結果と考察】

まずはじめに、親水性置換基を導入した PNA モノマーの合成についての検討を行った (Scheme 1)。ウラシルを出発物質として用い、

2段階の反応により、5位に親水性基を導入した。さらに3段階の反応を経て、ペプチド合成機に適応可能なPNAモノマー (**U_{peg1}**) を得ることに成功した。



Scheme 1. Reagents and conditions: a) Et₃N, H₂O, 60 °C, overnight; b) tri(ethylene glycol) monomethyl ester, conc. HCl, 130 °C, 2h; c) ethyl bromoacetate, Et₃N, CH₂Cl₂, 40 °C, overnight; d) Et₃N, H₂O, reflux, 1 h; e) tert-butyl-N-[2-(*N*⁹-fluorenylmethoxycarbonyl)-aminoethyl]-glycinate, HOBT, EDC.HCl, CH₂Cl₂, rt, overnight; f) TFA, Et₃SiH, rt, 1h.

また、同様の反応により、シトシン塩基の5位に親水性基を含むPNAモノマーの合成についての検討を行った。

続いて、ペプチド自動合成機を用いて、得られたPNAモノマー (**U_{peg1}**) のPNA鎖への導入についての検討を行った。

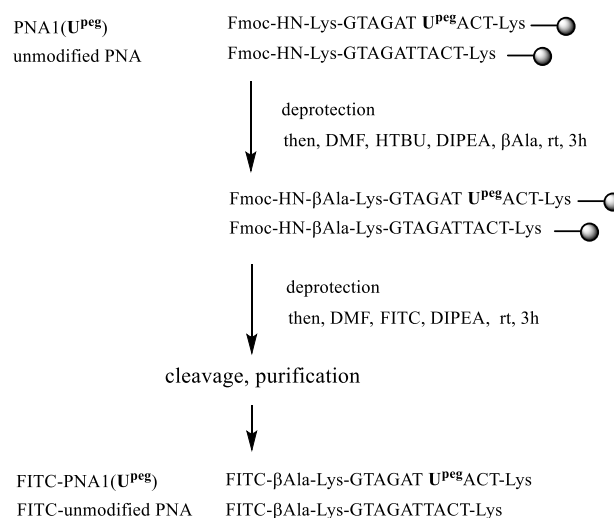
Table 1. PNA sequence used in this study

PNAs	Sequences
PNA1(U^{peg})	H ₂ N-Lys-GTAGAT U^{peg} ACT-Lys
PNA3(U^{peg})	H ₂ N-Lys-G U^{peg} AGAT U^{peg} ACU U^{peg} -Lys
unmodified PNA	H ₂ N-Lys-GTAGAT TACT-Lys
target DNA	5'-AGTAATCTAC-3'
FITC-PNA1(U^{peg})	FITC-βAla-Lys-GTAGAT U^{peg} ACT-Lys
FITC-unmodified PNA	FITC-βAla-Lys-GTAGATTACT-Lys

Table 1に示したように、未修飾のPNA鎖 (unmodified PNA) と、親水性基を含む **U_{peg1}** を1ユニット含む PNA1(**U_{peg1}**)、ならびに **U_{peg1}** を3ユニット導入された PNA3(**U_{peg1}**) を作成した。HPLCにより、精製を行った後、標的DNA鎖とハイブリダイズさせて融解温度を測定し、さらにCDスペクトルを測定した。その結果、ピリミジン塩基の5位にかさ

高い親水性ユニットを導入しても二重鎖形成能にほとんど影響を与えないことが分かった。また、HPLCの保持時間の比較により細胞膜透過性についての評価を行った結果、ユニット数を増やすことにより、細胞膜透過性が向上することが示唆された。さらに、実際の細胞を用いて、細胞膜透過性を評価するために、以下のScheme 2に示した方法により、PNA1(**U_{peg1}**)ならびに PNA3(**U_{peg1}**)を蛍光標識した FITC-PNA1(**U_{peg1}**)ならびに FITC-PNA3(**U_{peg1}**)を合成した。

Post-modification



Scheme 2. Post-modification of PNA1 and PNA3

これらを用いて、実際の細胞における細胞膜透過性の評価を行ったので、それらの結果についての報告を行う予定である。

また、これらの親水性基を導入したPNA鎖と組み合わせて使用することが可能な、新規蛍光PNAモノマーの合成についても検討を行っているので、その詳細についても報告を行う予定である。

【参考文献】

1) F. Wojciechowski, R. H. E. Hudson, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3807.