

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19750143  
 研究課題名 (和文) 細胞導入に最適化されたペプチド核酸の開発と細胞内機能発現  
 研究課題名 (英文) The development of peptide nucleic acids optimized cellular uptake and expression of their functions in cells

研究代表者  
 北松 瑞生 (KITAMATSU MIZUKI)  
 岡山大学・大学院自然科学研究科・助教  
 研究者番号：60379716

## 研究成果の概要：

水溶性の高いペプチド核酸の開発を行った。水溶性の高いペプチド核酸は細胞内に単独で導入できることが明らかとなった。しかし種々の塩基を含むペプチド核酸は天然の核酸を十分に認識することはできなかつた。そこで次に、親水性が高く、そして細胞内導入能をもつペプチドを修飾したペプチド核酸を開発し、これを siRNA のキャリアーとして用いた。これによりうまく細胞内での mRNA の機能発現制御に成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能関連化学、生物有機化学、生体機能材料

## 1. 研究開始当初の背景

ペプチド核酸は天然の核酸に塩基配列特異的に結合する人工核酸である。ペプチド核酸は天然の核酸よりも強く核酸に結合できることから、アンチセンス試薬や生体機能性ツールとして期待できる。しかし、従来のペプチド

核酸は水溶性が低いため、生体内で用いることが難しかった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では水溶性の高いペプチド核酸を開発し、かつ細胞内導入能を付与するこ

とで、生体内でも利用可能なペプチド核酸を開発することを目的とした。さらにこのペプチド核酸を用いることで細胞内の機能発現制御を目的とした。

本目的の成功は、核酸医薬をより有効に活用することができ、医療・診断の分野で役立つ。本研究は以下の二つのアプローチから上記目的を達成することとした。

(1) ペプチド核酸自体に水溶性および細胞内導入能を与え、そのペプチド核酸を核酸医薬とする。

(2) 従来のペプチド核酸に水溶性および細胞内導入能をもつペプチドを修飾し、そのペプチド核酸を核酸医薬のキャリアーとして用いる。

### 3. 研究の方法

(1) ペプチド核酸自体に水溶性と細胞内導入能を与える方法として以下のように行なった。

① 主鎖骨格中に水溶性の高いエーテル結合を含むペプチド核酸モノマーおよび三級アンモニウム塩を含むペプチド核酸モノマーを有機化学合成により作製した。

② 上記で作製したペプチド核酸モノマーをペプチド固相合成によりオリゴマー化し、新規水溶性ペプチド核酸を作製した。

③ 核酸との結合をUV融解曲線から調べた。

(2) 従来のペプチド核酸に水溶性と細胞内導入能を与える方法として以下のように行なった。

① 従来のペプチド核酸モノマーとアルギニンを用いてペプチド固相合成からアルギニンの8量体を修飾したペプチド核酸を作製した。

② このペプチド核酸を用いて、siRNAまたはshRNAを細胞内に導入し、そのRNAi効果をルシ

フェラーゼ活性から評価した。

### 4. 研究成果

(1)

① 側鎖にアデニン、チミン、シトシン、グアニンをもち、主鎖骨格にエーテル結合または第3級アンモニウム塩を含むペプチド核酸モノマーをそれぞれ合成した。合成の確認は<sup>1</sup>H-NMRおよび質量分析により行なった。いずれのモノマーもうまく合成できることがわかった。さらに、これらのモノマーを用いて新規水溶性ペプチド核酸が合成できることもわかった。

② UV融解曲線から合成した新規水溶性ペプチド核酸とそれに相補的なDNAもしくはRNAを混合し、ハイブリッドを形成するかを調べた。その結果、ハイブリッド形成時に認められるシグモイド曲線が認められなかった。以前の結果も含めて、本水溶性ペプチド核酸はプリンリッチな場合は、DNAやRNAに対し、塩基配列特異的に結合したが、シーケンスに対して汎用性はないということが本研究で明らかとなった。

(2)

① アルギニンの8量体を含むペプチド核酸をペプチド固相合成法により作製した。このペプチド核酸は質量分析により同定できた。また、このペプチド核酸の塩基配列に相補的な配列をダンダリングエンドを含むshRNAを作製した。

② このアルギニン8量体を修飾したペプチド核酸とそれに相補的なDNAとのUV融解曲線を測定した。その結果、本ペプチド核酸は塩基配列特異的に核酸とハイブリッドを形成で

きることが明らかとなった。さらにペプチド核酸に修飾されたアルギニンの8量体は完全相補な核酸に対しては、塩基間の相互作用が静電相互作用よりも優先されることが明らかとなった。

③ アルギニンの8量体を修飾したペプチド核酸とそれに相補的なダングリグエンドを含むshRNAとを混合し、CHO細胞内に導入できることが、共焦点顕微鏡やFACS解析により明らかとなった。

④ ルシフェラーゼ活性を抑制するRNAを含むshRNAと本ペプチド核酸を混合し、ルシフェラーゼを発現するCHO細胞に添加し、インキュベートした結果、shRNAと本ペプチド核酸を混合したときのみルシフェラーゼ活性が抑制されることが分かった。この結果より、アルギニンの8量体を修飾したペプチド核酸はうまくshRNAを細胞内に運搬することができ、そして運搬されたshRNAは細胞内でうまく機能発現を調整できることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Mizuki Kitamatsu, Takanori Kubo, Rino Matsuzaki, Tamaki Endoh, Takashi Ohtsuki, Masahiko Sisido, Carrier PNA for shRNA delivery into cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 有、19, 3410-3413

[学会発表] (計5件)

① 久保貴紀、北松瑞生、遠藤玉樹、山中智

史、大庭英樹、大槻高史、宍戸昌彦、「ペプチド核酸-細胞内導入ペプチド コンジュゲートを用いたRNAの細胞内送達」、2007日本化学会西日本大会、2007年11月11日、岡山。

② 北松瑞生、定石圭司、宍戸昌彦、「水溶性の高いペプチド核酸の合成」、2007日本化学会西日本大会、2007年11月11日、岡山。

③ 北松瑞生、久保貴紀、遠藤玉樹、大庭英樹、大槻高史、宍戸昌彦、「ペプチド核酸-膜透過ペプチド オリゴマーをキャリアーとして用いた siRNA の細胞内輸送」、第17回バイオ・高分子シンポジウム、2007年7月31日、東京。

④ T. Kashiwagi, M. Kitamatsu and M. Sisido, "Synthesis and Cell-internalization of a Cationic Peptide Nucleic Acid that Carries Pyrrolidine Rings", 20th American Peptide Symposium, 2007年6月26-30日、アメリカ。

⑤ 久保貴紀、北松瑞生、遠藤玉樹、大槻高史、大庭秀樹、宍戸昌彦、「ペプチド核酸-膜透過ペプチド コンジュゲートによる siRNA の細胞内輸送」、日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会、2007年5月19、20日、東京。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

①名称: 修飾型PNA/RNA複合体

発明者: 北松瑞生・他4名

権利者: 岡山大学・産業技術総合研究所

種類：特許権

番号：特願2008-028986

出願年月日：平成20年2月8日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北松 瑞生 (KITAMATSU MIZUKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：60379716

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし