

# ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH) 法のための 機能性ペプチド核酸の設計

池田 壽文\*・外崎 円\*\*・杉山 晶規\*\*\*  
(平成 28 年 1 月 14 日査読受理日)

## Design of Functionalized Peptide Nucleic Acids for the Whole-Mount *in situ* Hybridization (WISH)

IKEDA, Hisafumi TONOSAKI, Madoka SUGIYAMA, Akinori  
(Accepted for publication 14 January 2016)

キーワード：ペプチド核酸, 遺伝子解析, ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH)

Keywords : peptide nucleic acid, genetic analysis, Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)

### 1. 緒言

ペプチド核酸 (peptide nucleic acid; PNA) は, 1991 年に P. E. Nielsen らによって開発された人工核酸である<sup>1)</sup>. これは, DNA や RNA の糖リン酸骨格を, *N*-(2-アミノエチル)グリシンを基本単位とするペプチド骨格に置換した構造を有している (図 1).

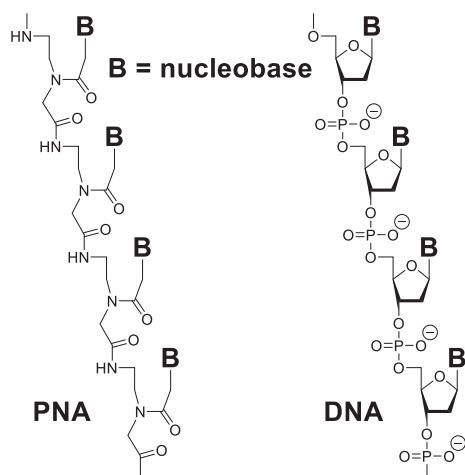


図 1 PNA の構造

このため, PNA は糖リン酸骨格由来の負電荷を持たず, 従来の塩濃度依存的な核酸同士の静電的な反発がなくなるので, DNA/DNA や DNA/RNA の二重鎖と比較して PNA/DNA や PNA/RNA の安定性が高く<sup>2)</sup>, 1塩基ミスマッチに対する認識能にも優れていることが知られている<sup>3)</sup>.

また, さらに特筆すべき特徴としては, 天然核酸が生体内ヌクレアーゼにより容易に分解されるのに対し, PNA はヌクレアーゼのみならずプロテアーゼに対しても完全耐性を有するので<sup>4)</sup>, アンチセンス医薬品や遺伝子解析用プローブとして有用な医用基材になると期待されていた<sup>5)</sup>. しかしながら, PNA 自身は水溶性に乏しく, また, 静電的に中性であるために細胞内への導入も困難であった. また, 当時は PNA に機能性を付加する手法も確立されていなかったため, PNA の疎水性などの欠点を補完する高機能化技術はほとんど開発されていなかった. 最近, 我々は「親水性機能」「光応答性機能」「生体膜透過機能」などといった PNA オリゴマーの高機能化のための技術基盤の開発に成功した<sup>6)</sup>. これは, 複数の機能性導入用人工ペプチドから機能性導入の目的に合わせて選択し, PNA オリゴマー合成時に使用するものであり, これまで不可能であった複数の機能性を同時に導入することができる特徴がある.

一方で, DNA マイクロアレイ法は, ゲノムの塩基配列解読のために開発された方法で, mRNA の網羅的な発現解析ができるという点に優れている<sup>7)</sup>. しかしながら, mRNA を抽出する時点で生体内情報が失われるという欠点がある. これに対して, mRNA を抽出することなく, 生物個体の機能性を維持した状態 (*in situ*) で, mRNA を検出することが可能な蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH) や<sup>8)</sup>, 細胞あるいは生物個体が生きたままの状態での解析可能なホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法 (WISH) は<sup>9)</sup>, 細胞の局在が明確であり, 周囲の影響を含めた mRNA の発現解析が可能であるため, ヒトの組織やマウスなどのモデル動物を利用することによって, 未知の遺伝子の機能解明や発生に関する遺伝子の働きにより詳細な解析ができる有用な解析手法である. しかし,

\* 環境教育学科 生物有機化学研究室

\*\* 東京理科大学 (現)京都市立医科大学

\*\*\* 岩手医科大学薬学部

DNA に由来する従来の検出プローブでは、細胞内酵素耐性や膜透過性に乏しいため、生細胞での検出が不可能であり、固定化や膜透過処理等の前処理が必要となり、擬陽性などの課題があった。これに対し、PNA は細胞内酵素耐性があるために、FISH や WISH に用いる検出プローブとして有用であると考えられる。

しかしながら、PNA 自身の難水溶性と難膜透過性を解決するためには、「生体膜透過機能」を設計し、それを付加した検出プローブの検証を行う必要がある。最近、ショウジョウバエのアンテナペディア遺伝子由来蛋白質 (Antp) 中の十数残基の塩基性ペプチドに膜透過性を促進する機能があることが発見された<sup>10)</sup>。その後、HIV-1 Tat 蛋白質中のアルギニンを多く含む領域にも同様の膜透過機能を有することが見出された<sup>11)</sup>。このうち、オリゴアルギニンは数ある膜透過ペプチドのうち同一のアミノ酸から構成されていて、一般的な固相ペプチド合成法により合成しやすいという利点があった。また、先述の機能性導入用人工ペプチドを用いれば、主鎖を逐次合成したあとで、側鎖部の伸長反応を行えば、「膜透過機能性」と「光応答性」を同時に導入できるのではないかと考えた。

以上のことから、完全酵素耐性を有し mRNA を高度に認識可能なプローブとして有用である PNA に、膜透過性と光機能性を併せ付加することで、これまで困難とされてきた生細胞での FISH や WISH を容易に実施することを目的として、我々は、PNA と膜透過性ペプチドを組み合わせた FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識膜透過機能性 PNA プローブの効率的合成方法の確立を行い、次に培養細胞を用いたモデル実験によって、このプローブの機能性に関する解析を行ったので報告する。

## 2. 研究方法

### 2.1. 対象となる mRNA の選定および対応する PNA オリゴマー (1, 2, 3) の設計

マウス胚性腫瘍細胞 (P19 細胞) で発現している PRP19 蛋白質をコードする mRNA のエクソン領域を標的とした<sup>12)</sup>。この領域のなかで、自己相補鎖を形成しない PRP19 蛋白質由来 mRNA に相補的な 20 塩基を抽出し「ターゲット塩基配列認識 (PNA) 領域」とした。「膜透過機能性 (ポリアルギ

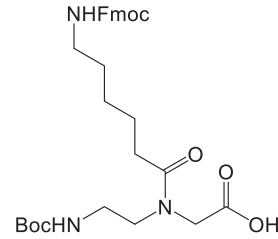


図2 機能性導入用人工ペプチド (4)

ニン) 領域」は、アルギニンを順次直接結合したオリゴアルギニンが次第に細胞毒性を示すようになることを考慮して<sup>13)</sup>、前述の機能性導入用人工ペプチド (4) を当該数逐次導入した後で、側鎖にアルギニンを付加する分岐型とした (図2)。「光応答性 (FITC) 領域」は直鎖の末端に導入した。以上のことから、「ターゲット塩基配列認識 (PNA) 領域」「膜透過機能性 (ポリアルギニン) 領域」「光応答性 (FITC) 領域」を順次結合した FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマー (1) を設計した (図3)。

また、膜透過機能性の有無を比較するために、「膜透過機能性 (ポリアルギニン) 領域」を省いた PNA オリゴマー (2) と、PNA オリゴマーの質量測定するために PNA オリゴマー (3) も設計した (表1)。PNA オリゴマー (1) の膜透過機能性領域が機能性導入用人工ペプチド (4) を7回連続で伸長反応させたあとで、側鎖方向にアルギニンを1個結合させたものであるのに対し、PNA オリゴマー (3) の膜透過機能性領域は側鎖方向にアルギニンを2個結合させたものである。側鎖方向の伸長反応の可否を確認するとともに、複雑化する構造においても目的物が合成できるか否かの確認も同時に行った。

### 2.2. FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマー (1, 2, 3) の合成

#### 2.2.1. FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマー (1) の合成

PNA オリゴマー (1) は、P. E. Nielsen らの方法を参考にして<sup>14)</sup>、パーソナル有機合成装置 (EYELA 製 CCS-600 モデル) を用いて *t*Boc 法で固相合成を行った。すなわち、

表1 設計した PNA オリゴマー (1, 2, 3)

光応答性	膜透過機能性	塩基配列認識	オリゴマー
FITC	アルギニン x 1	H-p(TGACTGCATCCCACATCC)-NH <sub>2</sub>	1
FITC	なし	H-p(TGACTGCATCCCACATCC)-NH <sub>2</sub>	2
FITC	アルギニン x 2	H-p(GCATCCCACATCC)-NH <sub>2</sub>	3

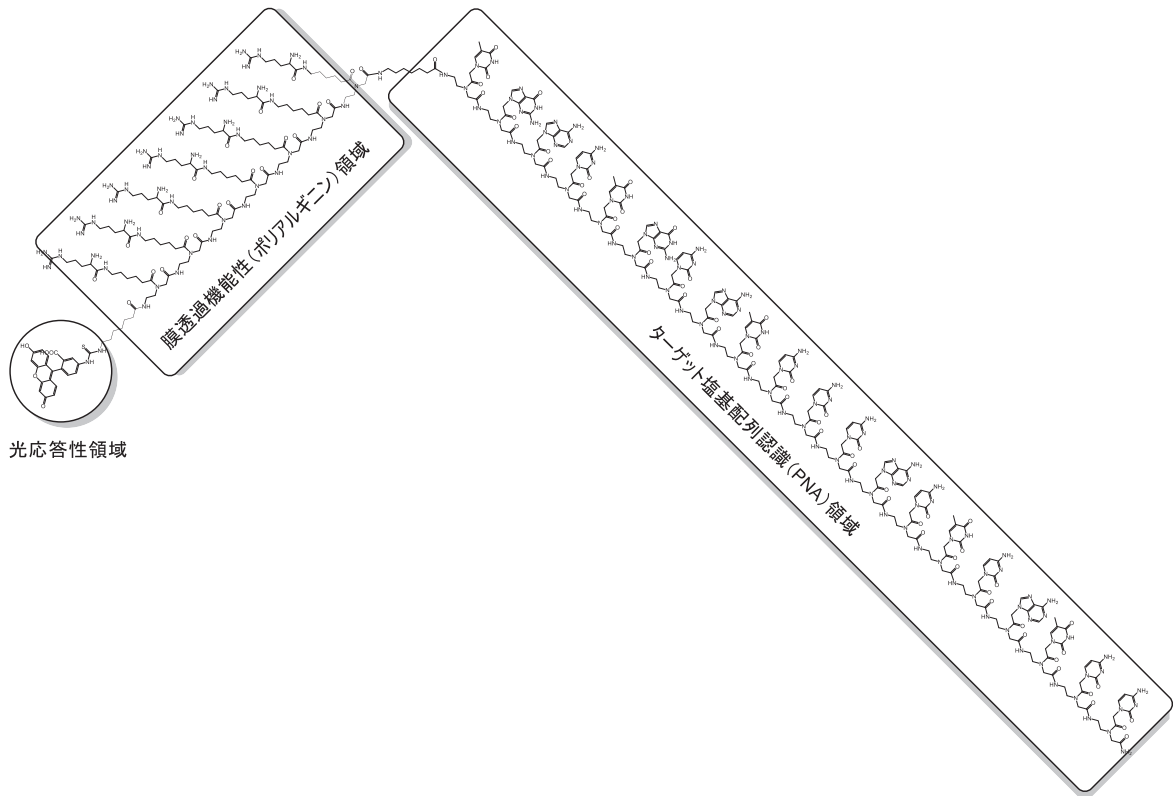


図3 FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマー (1) の構造

固相担体として MBHA (*p*-Methylbenzhydryl amine) レジン 193 mg (120  $\mu$ mol, 力価 0.62 mmol/g) を用いた。まず、固相担体を DMF (*N,N*-dimethyl formamide) で 60 分間膨潤させたあと、5% DIEA (*N,N*-diisopropylethylamine) /DCM (dichloromethane) で 15 分間振とうし、DCM で洗浄後、再度 5% DIEA/DCM で 15 分間の振とうし、塩酸塩である担体を脱塩処理し遊離アミノ基とした。次いで、長鎖 PNA オリゴマー合成を目的とした固相担体の低力価化を行った。担体を DCM と DMF で洗浄したあと、固相担体 (120  $\mu$ mol) に対して、モノマーユニット 80  $\mu$ mol, HATU (1-[Bis (dimethylamino)-methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate) 80  $\mu$ mol, および DIEA 160  $\mu$ mol の割合で混合し、5 分間静置させ、活性化を行った後、2 時間縮合反応した。反応が進行しなかった極微量の遊離アミノ基は、キャッピング試薬 2 ml (Acetic anhydride/pyridine/DMF=1/25/25) にて室温 30 分間でアセチル化 (キャッピング反応) した。一連の反応進行状況は、Ninhydrin 試薬にて遊離アミノ基の有無により確認した。

2 つ目以降のモノマーユニットの縮合反応は、モノマーユニット 144  $\mu$ mol (1.2 当量), HATU 144  $\mu$ mol (1.2 当量), および DIEA 240  $\mu$ mol (2.0 当量) の割合で行った。まず、5% *m*-cresol/TFA 3 ml にて室温 30 分間で処理し、アミノ基を保護している Boc (*tert*-butoxy carbonyl) 基を脱保護した。その後、担体を DCM と DMF で洗浄し、

Ninhydrin 試薬で担体および溶液が陽性であることを確認し、室温 1 時間でモノマーユニットを縮合した。Ninhydrin 試薬で陰性であることを確認したあと、未反応の遊離アミノ基に対しキャッピング反応を行った。この脱保護、縮合そしてキャッピングという反応工程を一サイクルとして、各種モノマーユニットを目的の配列通りに、逐次縮合した。

次いで、側鎖の伸長反応を行った。20% piperidine/DMF 1 ml で室温 30 秒間、ついで 2 ml で室温 15 分間攪拌し、アミノ基を保護している Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) 基を脱保護した。同様の操作をもう一度行い、Ninhydrin 試薬で陽性であることを確認した。これに、Fmoc-Arg(Mts)-OH (1.2 当量, Mts: Mesitylen-2-sulfonyl)-, HATU (1.2 当量), DIEA (2.0 当量) の DMF 溶液 1 ml を 5 分間静置した後に加え、室温 30 分間反応させた。この操作を再度繰り返した。担体を DMF, DCM で洗浄、乾燥し、Ninhydrin 試薬で陰性であることを確認したあと、キャッピング反応した。

PNA オリゴマー (1) と同様な手順で、PNA オリゴマー (2, 3) も適当なモノマーユニットを目的の配列通りに逐次縮合し、合成した。

### 2.2.2. FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマーの固相担体からの切り出し

固相合成終了後の MBHA レジンは、残留溶媒を DCM で置換し乾燥させたあとで、レジンからの切り出し試薬

(TFA/TFMSA/*p*-cresol/thioanisole=60/25/10/10, TFA: Trifluoroacetic acid, TFMSA: Trifluoromethane sulfonic acid) 10 ml を加え 2 時間攪拌した。なお, TFA・TFMSA 併用の条件へと段階的に酸性度をあげて行う Low-High TFMSA 法を用いた<sup>15)</sup>。この反応液をドライアイス MeOH 溶液で冷却したエーテル (100 ml) 中に静かに加え, 粗 PNA オリゴマーを白濁沈殿させ, デカンテーションにより切り出し試薬を除いた後, 沈殿物を回収した (エーテル沈殿法)。これを少量 MeOH に再度溶解し, さらに 2 回エーテル沈殿法を行って残留試薬を除去した。

### 2.2.3. FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマーの精製

エーテル沈殿法にて回収した粗 PNA オリゴマー中の PNA オリゴマー (1, 2, 3) の精製を目的として, 高速液体クロマトグラフシステム (HPLC, Waters 製 600E モデル) を使用した。分析条件は以下の方法を用いた (表 2)。また, PNA オリゴマーの質量測定は Bruker REFLEX II MALDI-TOF 質量分析システムにて, insulin と ubiquitin を外部標準物質として用いて, insulin 由来の  $[M+H]^+ = 5734.56$ ,  $[M+2H]^{2+} = 2867.88$  と, ubiquitin 由来の  $[M+H]^+ = 8565.89$ ,  $[M+2H]^{2+} = 4283.45$  でキャリブレーションしたあと, サンプル直接導入法および Linear Positive モードで行った。

### 2.3. P19 を用いた FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマーの機能評価方法

P19 細胞 (未固定) を各種濃度の PNA オリゴマーの入った培地にてインキュベーション (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) し, 適当な時間が経過した後, 4% paraformaldehyde/PBS (-) にて固定化した。次いで, 免疫染色 (一次抗体: PRP19α mAb, 二次抗体: ヤギ-α-mouse-IgG Rhodamine), 核染色 (染色剤: Hoechst33258) を行った。ここで, PRP19α

mAb は独自に作製したものをを用い, またヤギ-α-mouse-IgG Rhodamine は Santa Cruz Biotech 社製を使用した<sup>12)</sup>。細胞中蛍光シグナルの検出は, 共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡 (Bio-Rad 製 MRC-600 モデル) にて行い, また, 検出したデータは cool snap ver.1.0 にて解析した。FITC の蛍光は励起波長 488 nm を 0.01 秒間または 0.05 秒間照射して検出し, Hoechst33258 の蛍光は励起波長 405 nm を 0.1 秒間照射して検出した。検出された蛍光シグナルは, 解析ソフトによってそのままの状態 で保存した。ただし, Hoechst33258 の蛍光が検出しにくい場合, コントラスト調整を行った。

## 3. 研究結果

### 3.1. PNA オリゴマー (1, 2, 3) の合成

すでに報告している前駆体的 PNA モノマーユニット (4) を用いて, FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマーを構成する「ターゲット塩基配列認識 (PNA) 領域」「膜透過機能性 (ポリアルギニン) 領域」「光応答性 (FITC) 領域」を結合した多機能性 PNA の合成可否について確認した。

通常, HPLC 移動相はカラム保守を目的として 0.05% の TFA かギ酸を加える。今回, PNA オリゴマーにはイオン化しやすいポリアルギニン領域が存在するため, イオン化状態の違いで検出時間が異なりピークがブロード化する問題が生じた。そこで, TFA の濃度を二倍にしてイオン化しやすいアルギニン側鎖のグアニジル基を完全にプロトン化させ, 同時に, アルギニン同士の凝集化現象を解消する目的で, 精製直前に超音波処理を行ったところ, 明確なピークを検出することが可能となった (図 4)。

次いで, 精製した PNA オリゴマー (3) の質量分析を行った。最初, thin-film 法にて測定試料を滴下し, Reflector Positive モードでの測定を行ったが, 目的物に相当する分

表 2 PNA オリゴマー (1, 2, 3) の HPLC 分析条件

カラム	Wakosil II 5C18AR (φ 20×250+φ 20×50)		
溶離液	A 液: 0.1% TFA 水溶液、B 液: 0.1% TFA アセトニトリル溶液		
	グラディエント条件:		
	時間 (min)	A 濃度 (%)	B 濃度 (%)
	0.0	100	0
	50.0	50	50
	50.1	0	100
	55.0	0	100
55.1	100	0	
70.0	100	0	
流量	10 ml/min		
カラム温度	25°C		
検出波長	260 nm (PNA)、445 nm (FITC)		



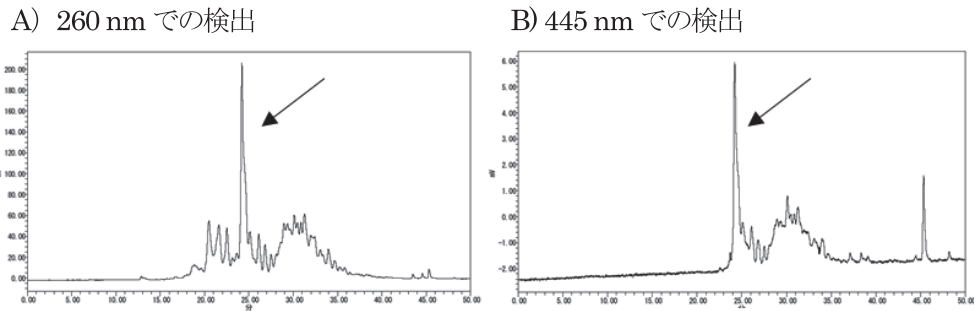


図4 合成後の粗 PNA オリゴマー (3) の HPLC 分析

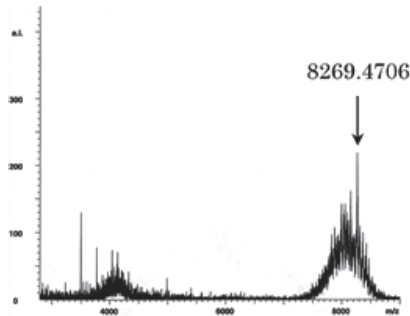


図5 PNA オリゴマー (3) の MALDI-TOF Mass 分析結果

質量ピークは存在しなかった。次に、直接法にて測定試料を滴下し、Linear Positive モードでの測定を行ったところ、目的の分子量 (clcd. 8266.0850) 付近でピーク群が検出され、中心 (矢印) は 8269.4706 であった (図 5)。

### 3.2. P19 を用いた FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマーの機能評価

#### 3.2.1. 細胞膜透過性および局在の評価

未固定の P19 細胞中に最終濃度が 10  $\mu$ M となるように設定した PNA オリゴマー (1, 2) を含む培地にて 24 時間インキュベーションし、固定化後に免疫染色、核染色を施

した細胞の挙動を確認した (図 6)。

その結果、膜透過機能性を付加していない比較用 PNA オリゴマー (2) は、細胞内において FITC 由来の蛍光発光をほとんど示さなかった (図 6 D, E)。それに対し、膜透過機能性を付加した PNA オリゴマー (1) は、ほぼすべての細胞が蛍光発光していた (図 6 A)。このことから、未修飾の PNA オリゴマーは細胞膜透過性を全く持っていないのに対して、ポリアルギニンで修飾することにより、細胞膜透過性が向上することが判明した。また、膜透過機能性を付加した PNA オリゴマー (1) の核への移行はほとんど見受けられなかった。

#### 3.2.2. mRNA 認識能の評価

同様の実験で固定化後の免疫染色を実施し、PRP19 蛋白質の有無について確認した。その結果、PNA オリゴマー (2) の取り込みが観察されていない FITC 由来の蛍光発光をほとんど示さなかった細胞において、Rhodamine 由来の顕著な蛍光発光が観察された (図 6 F)。一方、PNA オリゴマー (1) の取り込みが観察された FITC 由来の蛍光発光が顕著な細胞では、Rhodamine 由来の蛍光発光は全く確認できなかった (図 6 C)。このことから、細胞内に PNA オリゴマーが取り込まれた場合、PRP19 蛋白質に

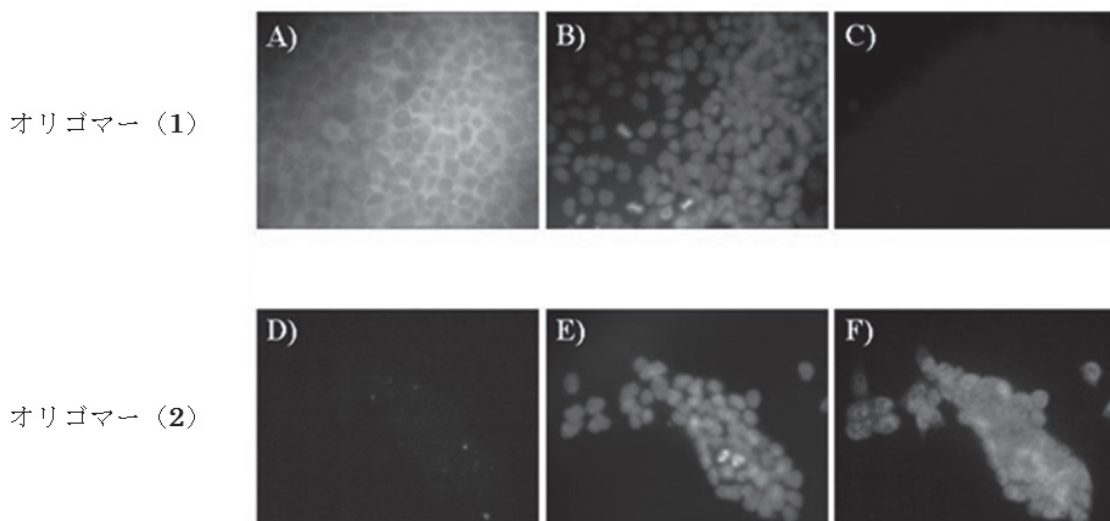


図6 FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマー (1) の機能性評価  
A, D) FITC の観察, B, E) Hoechst の観察, C, F) Rhodamine の観察

対応した mRNA を特異的に認識して二重鎖を形成し、PRP19 蛋白質の生成が抑制されることが判明した。

#### 4. 考察

今回、FISH や WISH を容易に実施することが可能なプローブの開発を目的として、FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマー (1, 2, 3) を設計した。これは、すでに開発済みの機能性導入人工ペプチド (4) を利用することで効率よく合成することができた。図 4 に示すように、HPLC での分析・分取において、超音波処理などの前処理をすることで、複雑化する構造であっても問題なくピーク検出が可能で、精製できることが明らかとなった。分子量測定は、明確な分子量ピークを示さずブロードなピークとなった (図 5)。これは、「膜透過機能性 (ポリアルギニン) 領域」がカチオン性の強いグアニジノ基を複数個持つことで、このような複雑なピークを示すと予想される。この問題は、検出方法のさらなる検討によって改善されようと考えている。

PNA オリゴマーが細胞膜を透過すると、細胞内に蓄積されるため、細胞内で FITC 由来の蛍光発光が検出される。一方で、細胞膜を透過しない場合は、PNA オリゴマーが存在しないため蛍光発光は観測できない。したがって、PNA オリゴマーの膜透過性の評価は、細胞内の FITC の蛍光発光の有無で判別できる。また、膜透過した PNA オリゴマーは、核へ移行するか、細胞質に留まるのか、または、核および細胞質の細胞全体に拡散するののかの、3つの局在パターンが考えられる。Hoechst33258 は核のみを染色することから、Hoechst33258 と蛍光発光位置が一致する場合は核内移行し、Hoechst33258 の周囲に局在する場合は細胞質に局在していると判断することが可能である。今回設計した PNA オリゴマーは Hoechst33258 と同じ位置での蛍光発光がほとんど観測されなかったことと核のまわりの蛍光発光が鮮明であったことから、今回設計した FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマーは膜透過機能性領域を付加することで容易に細胞内に導入可能であることと、その後、細胞質へ局在することが示唆された。

そのことを裏付ける結果は、PRP19 蛋白質発現の結果からも明らかになった。PRP19 蛋白質発現は、対応する mRNA を翻訳することによって起こる。今回、1次抗体、2次抗体を用いた免疫染色後の Rhodamine 由来の蛍光発光は観測されていない。そのことから、1次抗体が結合する PRP19 蛋白質の発現が抑制されていることを確認した。このことは、PRP19 蛋白質をコードする mRNA に翻訳阻害が起こったことを意味する。これは、mRNA に対して相補的な配列を有する PNA オリゴマーが mRNA と効果的に二重鎖を形成し、当該蛋白質のノックダウン現象が起こったと考えられる。

PNA は細胞中において完全酵素耐性を持っており、PNA/RNA 二重鎖が生体内酵素で代謝された場合、分解されるのは RNA のみである。生き残った PNA は分解を受けずに、再度 RNA を捕捉することが可能である。このことから、数多く転写される mRNA であっても一定量の PNA オリゴマーによって効率よく捕捉され、発現抑制効果が明確になったのではないかと考えている。

以上のことから、PNA と膜透過性ペプチドを組み合わせた FITC 標識膜透過機能性 PNA オリゴマーは、これまで困難とされてきた生細胞での FISH や WISH が容易に実施できる可能性を示すことができた。今回は、膜透過機能性を期待したポリアルギニンは 1 種類しか設計していない。ポリアルギニンはその数に比例して正電荷が増えるため、膜透過機能性に核移行性を付加することが予想できる。同時に、ポリアルギニンは 7~8 量体くらいから細胞毒性を示すようになることも報告されている<sup>13)</sup>。このポリアルギニンの数的効果を明らかにすることにより、より良いかつ多様な膜透過機能性を創造できると期待している。

#### 《参考文献》

- 1) P. E. Nielsen, *Science*, **1991**, 254, 1497-1500.
- 2) M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, and P. E. Nielsen, *Nature*, **1993**, 365, 566-568.
- 3) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, and R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1895-1897.
- 4) V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen, and P. E. Nielsen, *Biochemical Pharmacology*, **1994**, 48(6), 1310-1313.
- 5) B. M. McMahon, J. A. Stewart, M. D. Bitner, A. Fauq, D. J. McCormick, E. Richelson, *Life Sciences*, **2002**, 71, 325-337; H. Jakob Larsen, T. Bentin, P. E. Nielsen, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1999**, 1489, 159-166; G. Aldrian-Herrada, M. G. Desarmenien, H. Orcel, L. Boissin-Agasse, J. Mery, J. Brugidou and A. Rable, *Nucleic Acids Research*, **1997**, 26, 4910-4916; J. G. Hacia, E. A. Novotny, R. Aeryn Mayer, S. A. Woski, M. A. Ashlock and F. S. Collins, *Nucleic Acids Research*, **1999**, 27, 4034-4039.
- 6) H. Ikeda, F. Kitagawa, Y. Nakamura, *Tetrahedron*, **2007**, 63(25), 5677-5689.
- 7) Recent review: G. Dorman, F. Darvas, *Chemical Genomics and Proteomics (2nd Edition)*, **2013**, 1-48.
- 8) Recent review: T. Liehr, A. Weise, A. B. Hamid, X. Fan, E. Klein, N. Aust, M. A. K. Othman, K. Mrasek,

- N. Kosyakova, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **2013**, *13*(3), 251-255.
- 9) Recent review: H. Ohuchi, S. Noji, *Soshiki Saibo Kagaku Koshukai*, **2013**, *38*, 89-100.
- 10) D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassing, and A. Prochiantz, *The Journal of Biological Chemistry*, **1996**, *271*(30), 18188-18193.
- 11) E. Vives, P. Brodin, and B. Lebleu, *The Journal of Biological Chemistry*, **1997**, *272*(25), 16010-16017.
- 12) Y. Urano, M. Iiduka, A. Sugiyama, H. Akiyama, K. Uzawa, G. Matsumoto, Y. Kawasaki, F. Tashiro, *The Journal of biological chemistry*, **2006**, *281*(11), 7498-514.
- 13) S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, *276*(8), 5836-5840.
- 14) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson and H. Orum, *J. Peptide Research*, **1997**, *49*, 80-88.

### Abstract

Peptide nucleic acid (PNA) is a biopolymer in which the DNA sugar–phosphate backbone has been replaced by a pseudopeptide. PNAs are superior to natural nucleic acids in numerous ways, namely: (i) they can be easily synthesized by solid-phase tBoc or Fmoc chemistry, (ii) are extremely stable against cellular nucleases and proteases, and (iii) can hybridize with complementary DNA with high affinity. Modification of the PNA backbone and incorporation of functional nucleobases have been examined with biotechnology applications in mind. We recently synthesized photoactive PNA oligomers containing photoactive molecules incorporated in the PNA backbone by using an artificial amino acid (**4**).

Establishment of an effective method of introduction of photoactive molecules such as fluorescein derivatives at specific oligomer sites will be of great importance in the development of a photofunctional tool to understand gene functions and to use genomic data. For example, Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) is a convenient method for visualizing complete expression patterns in embryos in different developmental stages. However, WISH has the disadvantage that the experimental conditions must be highly controlled to prevent some problems with nonspecific background. These problems will be circumvented by preparing fluorescent PNA probes.

Herein, we report the novel application of several photoactive PNAs to WISH analysis. We designed a cell-penetrating domain for transferring photoactive PNAs into cells because the PNA oligomer is hydrophobic and has low cell permeability in general. We selected oligoarginine as the cell-penetrating domain in the known cell-penetrating peptides because a sequence constituted of the same amino acids has been found to be extremely suitable for solid phase peptide synthesis (SPPS). Designed PNA oligomers (**1-3**) could be synthesized using an artificial amino acid (**4**), and arginine could be efficiently incorporated into the cell-penetrating domain of PNA oligomers (**1** and **3**) at desired positions. PNA oligomer (**1**) including a cell-penetrating domain could be introduced into P19 cells after incubation of cells with the oligomer (**1**) for 24 h. Furthermore, immunostaining confirmed that expression of the PRP19 protein, which was localized in the cytoplasm of P19 cells, was suppressed (Figure 6). These results suggested that the PNA oligomer (**1**) recognized the corresponding target PRP19 mRNA after introduction into P19 cells and could be designed as fluorescently labeled PNA probes with cell membrane permeability for WISH analysis.