

## ゲノム操作を志向した光を用いた長鎖オリゴ核酸への DNA 2 本鎖侵入法開発

(北陸先端大バイオ機能<sup>1)</sup>) ○ZUMILA HAILILI<sup>1</sup>・MO JUNLING<sup>1</sup>・藤本 健造<sup>1</sup>

Development of photo-triggered DNA double-strand invasion method targeting long chain oligonucleotides oriented to genome manipulation (<sup>1</sup>Biofunctional Medical Engineering Research Area, *Japan Advanced Institute of Science and Technology*) ○ZUMILA HAILILI,<sup>1</sup> MO JUNLING,<sup>1</sup> Fujimoto Kenzo<sup>1</sup>

Natural DNA restriction enzymes bind duplex DNA with high affinity at multiple sites. For artificial restriction moieties, however, it is difficult to open long-range double-strand DNA for efficient cleavage. In our previous research we have reported photo-induced double-duplex invasion (pDDI) methods using 3-cyanovinylcarbazole nucleoside (<sup>CNV</sup>K)<sup>1,2</sup>. <sup>CNV</sup>K is an ultra-fast photo-cross-linker developed by our lab. <sup>CNV</sup>K can form covalent bond to pyrimidine bases in -1 position in its complementary strand within 1 s under 366 nm UV irradiation. And it has succeeded in achieving double-duplex invasion. However, the inter-probe cross-linking of the <sup>CNV</sup>K-containing probes has been a major drawback in gaining maximum invasion rate. We have confirmed that replacing the pyrimidine at the cross-linking site in the probes with 5-cyanouracil (<sup>CNU</sup>) can suppress inter-probe cross-linking while maintaining the pDDI efficiency<sup>3</sup>. In this study, we investigated the condition for improving the overall pDDI efficiency using a long-range dsDNA as a template. And for pDDI probes, photo-cross-linkable ODNs containing <sup>CNV</sup>K and <sup>CNU</sup> as inter-probe cross-linking suppresser were tested.

**Keywords :** *Genome Manipulation; DNA Photo-cross-linker; Double Duplex Invasion*

遺伝子工学等で日常的に用いられている制限酵素は、二重鎖 DNA に対して高い親和性を有し配列選択的に DNA を切断する。一方、人工制限酵素では、優れた切断能力を有しているとしても、そもそも長鎖二本鎖 DNA 引き剥がすこと自体が困難である。我々の以前の研究では、3-シアノビニルカルバゾールヌクレオシド (<sup>CNV</sup>K) を用いた光誘導二重鎖侵入 (pDDI) 法を報告している<sup>1,2)</sup>。<sup>CNV</sup>K は当研究室が開発した超高速光架橋剤である。<sup>CNV</sup>K は、366nm の紫外線照射下で 1 秒以内に相補鎖の-1 位のピリミジン塩基と共有結合を形成することができる。しかし、<sup>CNV</sup>K を含むプローブのプローブ間架橋は、最大侵襲率を得る上で大きな欠点であった。我々は、プローブの架橋部位のピリミジンを <sup>CNU</sup> で置換することにより、pDDI 効率を維持した上プローブ間架橋を抑制できることを確認している<sup>3)</sup>。本研究では、長距離 dsDNA を鋳型として、pDDI 全体の効率を向上させるための条件を検討した。そして、pDDI プローブとして、プローブ間架橋抑制剤として <sup>CNV</sup>K と <sup>CNU</sup> を含む光架橋性 ODN を試験した。

1) Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 3227-3230.

2) S. Nakamura, H. Kawabata, and K. Fujimoto. *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 7616-7619.

3) K. Fujimoto, A. Hirano, Y. Watanabe, A. Shimabara, S. Nakamura, *ChemBioChem.*, **2021**, *22*, 3402-3405.