

## 論文審査の結果の要旨

氏名 平野 清一

本論文は、第1章「General Introduction」、第2章「Crystal structures of SpCas9 mutants」、第3章「Crystal structure of CdCas9」、第4章「Crystal structure of RNA methyltransferase」、第5章「General Discussion」の計5章から構成されている。

第1章は、本論文の序章であり、原核生物の獲得免疫機構である CRISPR-Cas9 系を構成するタンパク質や RNA について説明され、実際のゲノム編集においてどのように Cas9 が使われ、どのような問題点があるか提起されている。そのひとつに、Cas9 が PAM 配列とよばれる DNA の塩基配列を特異的に認識するために、ゲノム編集における標的部位が制限されるという点が挙げられ、本研究がゲノム編集技術の開発に貢献することが示されている。また、本論文の後半部で議論される RNA 修飾酵素の関わる m<sup>6</sup>A 修飾経路について、m<sup>6</sup>A 修飾が可逆的におこなわれ様々な生理機能に関わっていることから、研究対象が生物学において重要であることを述べている。

第2章では、*Streptococcus pyogenes* に由来する Cas9 の改変体の精製、結晶化、X 線結晶構造解析について詳細に記述されている。論文提出者は、3 種類の PAM 配列とこれらを認識する 3 種類の Cas9 改変体の組み合わせをもつ 3 つの結晶からそれぞれ高分解能構造を決定した。決定した結晶構造および生化学解析から、Cas9 改変体においてどのように PAM 認識機構が変わったか議論が行なわれた。Cas9 に導入した 3 つないし 4 つの変異が協働的に作用することによって DNA の構造変化が誘導され異なる PAM 配列を認識できるようになったことを提唱した。

第3章では、*Corynebacterium diphtheriae* に由来する Cas9 (CdCas9) の精製、結晶化、X 線結晶構造解析について詳細に記述されている。決定した結晶構造および生化学解析から、CdCas9 による特異的な PAM 認識機構が明らかになった。CdCas9 のもつ疎水的なアミノ酸残基によって PAM 配列中のチミンのメチル基が認識されており、Cas9 は水素結合によって PAM 配列を認識するというこれまでの見解とは異なっており、CRISPR-Cas9 系の多様性を裏付けた。

第4章では、*Homo sapiens* および *Danio rerio* に由来する RNA 修飾酵素 CAPAM の精製、結晶化、X 線結晶構造解析について詳細に記述されている。決定した結晶構造および生化学解析から、CAPAM がどのように mRNA の 5'-キャップ構造を認識し m<sup>6</sup>A 修飾をおこなうか明らかになった。構造比較から、CAPAM は他の m<sup>6</sup>A 修飾酵素とは大きく異なるドメインを有しており、このドメインが mRNA 標的部位を選択していることが明らかになった。

第5章では、論文全体を通じた総括と、本研究で解明された Cas9 や CAPAM の分子機構がゲノム科学に広く知見を与えることが述べられている。

本論文では、異なる生物種由来の Cas9 を 2 つと RNA 修飾酵素の計 3 つの結晶構造をいずれも高難易度ながら精力的に決定しており、さらに、3 つの結晶構造それぞれについて独立した 3 報の原著論文にまとめていることから、ゲノム科学において幅広く知見を与えることが期待される。また構造解析と生化学解析の結果が合致していることから、本研究で決定された結晶構造が、生物学に有用な知見を与えることが期待される。なお、本論文は、Omar O. Abudayyeh 博士、Jonathan S. Gootenberg 博士、Feng Zhang 博士、堀居拓郎博士、畑田出穂博士、杉田愛氏、廣瀬豊博士、七野悠一博士、岩崎信太郎博士、穉近慎一郎氏、鈴木健夫博士、鈴木勉博士、石谷隆一郎博士、西増弘志博士、濡木理博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となり研究が遂行されており、その寄与は十分であると判断する。したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。