

論文審査の結果の要旨

氏名 平野 央人

本論文は原核生物の CRISPR-Cas 機構のうち type II-B に属する *Francisella novicida* 由来 Cas9 (FnCas9) のガイド RNA、標的 DNA および非標的 DNA 複合体の構造解析および FnCas9 の機能解析に関して述べられたものであり、Introduction, Result, Discussion の 3 項目を中心として構成されている。

Introduction の項目では Cas9 の分子機構、Cas9 のゲノム編集への応用、Cas9 の過去の構造解析、Cas9 の由来する生物種による多様性など、当該分野における先行研究に関して簡潔に述べられている。その中で、Cas9 をゲノム編集へ応用する際に PAM の認識が標的可能な配列の制限になっていること、また、type II-B に属する Cas9 の構造解析は過去に報告例がなく、構造既知の Cas9 との配列相動性の低さから type II-B に独立した分子機構があることなどが記されており、本論文の研究目的を提起している。

Result の項目では、本論文の研究で明らかとなった実験結果が述べられている。申請者はまず、プラスミド DNA を用いた機能解析を行っており、FnCas9 は 5'-NGG-3' という配列を PAM として認識し、3 文字目の G は A であっても許容されることを明らかにした。次に、FnCas9-ガイド RNA-PAM (5'-NGG-3' または 5'-NGA-3') を含む二本鎖 DNA の X 線結晶構造解析を行い、その結晶構造を 1.7 Å で決定した。結晶構造から、FnCas9 の RNA 依存的な DNA 切断機構が明らかにされた。また、FnCas9 は過去に報告例のないフォールディングのドメインを 3 つ含む、構造既知の Cas9 とは大きく異なる構造を形成していることから、Cas9 の予想外の多様性が明らかにされた。また、本論文では構造情報を基にした FnCas9 の PAM の改変について述べられている。FnCas9 の 5'-NGG-3' は 2 つのアルギニン残基によって 2 つの G がそれぞれ認識されていた。申請者は、アルギニン残基による塩基特異的な相互作用を欠失させ、塩基非特異的な相互作用によって失われた相互作用を補填することにより、PAM を拡張することができる考えた。その仮説に基づき変異体を作成した結果、5'-YG-3' PAM を認識する E1369R/E1449H/R1556A という 3 重変異体を見出した。この変異体の構造解析も行われており、5'-YG-3' PAM の認識機構が明らかにされている。さらに、本論文ではマウス受精卵における機能解析の結果から、野生型 FnCas9 および 3 重変異体 FnCas9 を用いることによって 5'-NGG-3' および 5'-YG-3' PAM をもつ標的配列のゲノム編集が可能であることを示しており、Cas9 が標的可能な配列の広範化に貢献している。

Discussion の項目では本論文における研究で得られた知見のもつ一般的な意義に関して総合的に議論されている。まず、FnCas9 の構造から、type II-B の Cas9 がもつ共通の分子機構に関して述べられている。さらに、FnCas9 と構造既知の Cas9 との比較によって Cas9 の多様性および共通性に関して議論し、こうした多様性はファージがもつ Anti-CRISPR タンパク質と Cas9 との共進化によるものであると論じている。さらに、2018 年に行われた

Streptococcus pyogenes 由来 Cas9 の PAM の改変の実例を基に、本論文で考案した PAM の改変のコンセプトは FnCas9 のみならず他の Cas9 に対しても適応可能な一般的な手法であると述べられている。

本論文で述べられている結果は過去に報告例のない新規の知見であり、CRISPR-Cas 機構の研究において、基礎をよび応用の両面から重要な貢献をなすものである。論文は明瞭に記述され、確かな実験データと先行研究に基づき論じられている。なお、本論文の一部は、Gootenberg, J.S., Horii, T., Abudayyeh, O.O., Kimura, M., Hsu, P.D., Nakane, T., Ishitani, R., Hatada, I., Zhang, F. Nishimasu, H., Osamu, N.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。