

論文審査の結果の要旨

氏名 山田 真理

本論文は、第1章「General Introduction」、第2章「PAM specificity of *Campylobacter jejuni* Cas9」、第3章「X-ray crystallographic analysis of *Campylobacter jejuni* Cas9」、第4章「Crystal structures of the minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* Cas9」、第5章「Generation of mutants with enhanced catalytic activity of CjCas9」、第6章「General Discussion」の6章から構成されている。

第1章はイントロダクションにあたり、前半では、本論文中でターゲットとしている CRISPR-Cas システムの分類と基本的なメカニズムについてまとめている。後半では、構造生物学に基づく RNA 依存性 DNA ヌクレアーゼである Cas9 の作動機構、及び研究目的が記述されている。

第2章では本研究のターゲットタンパク質である *Campylobacter jejuni* Cas9 (CjCas9) が認識する PAM 配列の探索について述べられている。Cas9 が標的 DNA 配列を認識する際、PAM と呼ばれる生物種に特有の短い塩基配列が必要である。先行研究により、CjCas9 は 5' -NNNNACA-3' を PAM として認識するとされていたが、*In vitro* 及び *in vivo* の両方において PAM 配列の探索を実施したところ、CjCas9 の PAM 配列は 5' -NNNNACA-3' ではなく、より広範な 5' -NNNVR YM-3' であることが明らかとなった。

第3章では、CjCas9-ガイド鎖 RNA-相補鎖 DNA-非相補鎖 DNA 四者複合体の X 線結晶構造解析について記述されている。論文提出者は、CjCas9 及びガイド鎖 RNA の精製、そして四者複合体の結晶化を実施し、単波長異常分散法を用いた位相決定によって、CjCas9-ガイド鎖 RNA-相補鎖 DNA-非相補鎖 DNA 四者複合体の結晶構造を高分解能で決定した。

第4章では、決定した結晶構造に基づいて、CRISPR-Cas9 システムにおける予想外の多様性について記述されている。CjCas9 のガイド鎖 RNA は三重らせんを含むシュードノット構造をもっており、SAM-II リボスイッチやテロメラーゼ RNA サブユニット TER に見られる既知のシュードノット構造とは異なっていた。この構造的知見は、ガイド鎖 RNA の構造的多様性を強調し、RNA 三重らせんの天然レパートリーを拡大した。また、他の Cas9 オルソログが非相補鎖 DNA

のヌクレオチド配列を「読み取り」して PAM 認識を達成する一方、CjCas9 は相補鎖・非相補鎖 DNA の両方を認識することによって、CjCas9 が 5'-NNNVR YM-3' PAM を認識することを明らかにした。さらに、最小の Cas9 オルソログである CjCas9 と他の Cas9 オルソログとの構造的比較によって、Cas9 の最小機能単位の洞察を提供した。これらの発見は、CRISPR-Cas9 システムの理解を強化し、Cas9 エンジニアリングのための基盤を提供した。

第 5 章では、第 4 章での構造的知見に基づいた CjCas9 の活性向上変異体創出について記述されている。最小 CjCas9 は、ウイルスベクターへの導入効率が高いなどの利点を有するため、ゲノム編集に応用されることが期待されている。しかしながら、CjCas9 は弱い DNA 切断活性が原因で、汎用性の高い大型 Cas9 よりも真核細胞におけるゲノム編集効率が低い。この背景から、論文提出者は構造的知見に基づき活性向上変異体の探索を行い、野生型 CjCas9 の 2 倍の活性強度を有する変異体の創出に成功した。

第 6 章では、論文全体の総括が記述されている。

なお、本論文は、渡邊裕斗、Jonathan S. Gootenberg、平野央人、F. Ann Ran、中根崇智、石谷隆一郎、西増弘志および濡木理との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったものであり、論文提出者の寄与が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。