

## 論文審査の結果の要旨

氏名 山野 峻

本論文は、第1章「General introduction」、第2章「Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA」、第3章「Structural basis for the altered PAM recognition by engineered CRISPR-Cpf1」、第4章「Structural basis for the canonical and non-canonical PAM recognition by CRISPR-Cpf1」、第5章「General discussion」の計6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としてのCRISPR-Cas機構の役割とメカニズム、特にウイルス感染等にもない細胞内に侵入する外来核酸の認識と分解に関わるエフェクター分子に関する先行研究について記述されている。本論文では特に2015年に新規に同定されたエフェクター分子であるCpf1に関して論じている。CRISPR-Cas機構でCpf1と同様にエフェクター分子として働くCas9は広く研究されており、結晶構造も決定されている一方で、Cpf1はCas9とは異なる特徴を有するものの、構造情報が得られていなかったためその作動機構は不明であった点に関して記されている。また、Cas9は優れたゲノム編集ツールとして利用されており、その応用例の紹介とともにCas9の生命科学分野への影響の大きさが記されている。以上の内容を踏まえ、Cas9と同様にゲノム編集ツールへの応用が期待されるCpf1の結晶構造の決定と構造に基づくCpf1の作動メカニズムの理解という本研究の最終目標を提起している。

第2章では、*Acidaminococcus sp.*に由来するCpf1とそのガイドRNAと標的DNAとの複合体の結晶構造について記述されている。また、PAMと呼ばれる標的DNAに存在する特定のモチーフを認識する機構、および標的DNAの切断機構について、その構造をもとに議論されている。Cpf1はTリッチなPAMを2本鎖DNAの形状と塩基の両方を認識することにより認識可能であることが述べられている。また、標的DNAの切断ではRuvCドメインというヌクレアーゼドメインが2本鎖DNAの両方の鎖の切断に関わっており、Nucドメインが切断を補助することが今回得られた構造と生化学実験から明らかにされている。最後にCas9とCpf1の共通点と相違点が述べられている。

第3章では、昨年報告されたCpf1のPAM認識を変化させた改変体について、変化したPAM認識機構について記述されている。RVR改変体とRR改変体という2つの改変体が報告されており、それぞれTWTV, TYCVという配列を認識するもののその認識機構は不明であった。RVR改変体をTATA PAMを含む状態で、RR改変体とTCCA PAMを含む状態で構造解析を行った結果、多くの塩基は2本鎖DNAの主溝側から認識されており、またPAMの相補鎖の塩基がよく認識されていることが明らかとなった。導入された変異とPAM認識との関係が議論されている。

第4章では、*Lachnospirasea bacterium*由来のCpf1についてガイドRNAと標的DNAとの複合体の結晶構造を決定し、既知のCpf1の構造との比較からCpf1ファミリーにおける

構造的な共通点と相違点について記述されている。また、Cpf1 による制限のゆるい PAM 認識機構について、4 種の異なる DNA 配列について結晶構造解析を行うことで明らかにしている。Cpf1 の全体構造は生物種間で高度に保存されていることが述べられている。また、Cpf1 の PAM 認識には標的 DNA と相互作用する PI ドメインの動きが重要であることが明らかにされた。このような Cpf1 の PAM 認識機構は Cas9 のものと大きく異なることが言及されている。

第 5 章では、本研究で明らかになった Cpf1 の構造と、これまでに報告された他の生物種に由来する Cpf1 や他状態の Cpf1 についての構造比較をおこない、Cpf1 の構造変化のメカニズムが議論されている。また、PAM 認識機構の比較から、さらなる Cpf1 の改変の可能性についても言及されている。

本論文では、*Acidaminococcus sp.* および *Lachnospirasea bacterium* 由来の Cpf1 についてガイド RNA と標的 DNA との複合体の結晶構造が決定され、さらに *in vivo*, *in vitro* での機能解析がおこなわれている。本研究は、構造が全く未知であった Cpf1 についてその作動メカニズムの理解を大きく進展させ、Cpf1 を用いたゲノム編集ツールの開発を促進するものである。なお、本論文の第 2 章、第 3 章、第 4 章は Berned Zetsche 氏、Iana Fedorova 氏、Linyi Gao 氏、Ian M. Slaymaker 博士、Yinqing Li 博士、Feng Zhang 博士、Eugene V. Koonin 博士、Kira S. Makarova 博士、平野央人氏、西増弘志博士、石谷隆一郎博士、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。