

氏 名 石井 智子

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大乙第288号

学位授与の日付 2024年3月22日

学位授与の要件 学位規則第6条第2項該当

学位論文題目 クロマチンアクセシビリティを制御する新規遺伝子の同定とその作用  
機序解析

論文審査委員 主 査 高田 慎治  
基礎生物学コース 教授  
中山 潤一  
基礎生物学コース 教授  
坪内 知美  
基礎生物学コース 准教授  
田上 英明  
名古屋市立大学 大学院理学研究科 准教授  
宮成 悠介  
金沢大学 ナノ生命科学研究所 准教授

# 博士論文の要旨

氏 名：石井 智子

論文題目：クロマチンアクセシビリティを制御する新規遺伝子の同定とその作用機序解析 (Identification and characterization of novel modulators of chromatin accessibility)

Eukaryotic genomic DNA is wrapped around histones, forming chromatin that is tightly packaged into higher-order chromatin structure. This configuration exhibits variability, and the degree of local compaction influences the physical accessibility to DNA, referred to as “chromatin accessibility”. Chromatin generally presents a highly compacted structure and inaccessible, preventing the binding of proteins such as transcription factors and DNA repair machinery; however, certain regions, including active promoters and enhancers, are accessible. Chromatin accessibility plays an important role in DNA-templated reactions like transcription, DNA repair, and replication, crucially contributing to the establishment and maintenance of cellular identity. Dynamic alterations in chromatin accessibility accompany various biological processes, including development, differentiation, reprogramming, and disease progression. Multiple factors, such as histone modifiers, chromatin remodelers, histone chaperones, and histone variants, are acknowledged for their roles in regulating chromatin accessibility. However, a comprehensive understanding of the molecular mechanisms and networks governing chromatin accessibility remains elusive.

In this study, I sought to identify novel modulators of chromatin accessibility, hypothesizing that multiple pathways regulate chromatin accessibility. I conducted a genome-wide CRISPR screening combined with an optimized ATAC-seq (Assay of

transposase-accessible chromatin with visualization) approach. The ATAC-seq method utilizes Tn5 transposase assembled with fluorescently labeled adaptor DNAs to selectively bind and insert the adaptors into accessible chromatin, allowing for both visualization and quantification of accessible chromatin at the single-cell level. The optimized ATAC-seq method includes the usage of a 19 bp adaptor DNA, shorter than the original, and unfixed cells, enabling more sensitive and specific detection of accessible chromatin.

The CRISPR screening using human haploid eHAP cells identified 74 and 83 negative- and 22 and 19 positive-effector genes on day 5 and 7 post-infection of sgRNA lentivirus library, respectively. In addition to known chromatin regulators like *CREBBP*, *EP400* and *PARP1*, the identified modulators included numbers of previously unrecognized proteins such as *TFDP1*, *HNRNPU*, *EIF3D*, and *THAP11*, belonging to diverse biological pathways, including RNA-processing, N-terminal protein acetylation, and translation initiation. ATAC-seq analysis upon depletion of certain identified modulators revealed that the modulators have distinct and specific effects on chromatin accessibility.

Among the identified modulators of chromatin accessibility, depletion of transcription factor TFDP1 drastically increased chromatin accessibility throughout genome. The same results were also observed in other cell lines including human normal diploid TIG3 cells and mouse NIH3T3 cells, which motivated me to study the function of TFDP1 in detail. Initially, I conducted MNase-seq (micrococcal nuclease sequencing) to clarify the impact of TFDP1 depletion on nucleosome occupancy and found that loss of TFDP1 reduced nucleosome occupancy in a genome wide manner. Next, to investigate the molecular mechanism underlying the TFDP1-mediated regulation of chromatin accessibility, I performed rescue experiments using TFDP1 mutants lacking either DNA binding domain or E2F binding domain, crucial for TFDP1's

heterodimerization with E2Fs. Neither of them could reverse the change in chromatin accessibility upon TFDP1 depletion, suggesting that both the DNA binding activity and heterodimerization with E2Fs are crucial for regulating chromatin accessibility. I also executed ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation sequencing) analysis using eHAP cells in which a 3xFLAG tag was knocked in at the N-terminus of TFDP1 and compared the binding sites of TFDP1 with the differentially accessible regions upon TFDP1 deletion. TFDP1 depletion increased chromatin accessibility not only at its binding sites but also at non-binding sites, indicating both direct and indirect regulation of chromatin accessibility by TFDP1. Given the genome-wide elevation of chromatin accessibility and a widespread reduction in nucleosome occupancy following TFDP1 depletion, I hypothesized that TFDP1 regulates the expression level of histones. ChIP-seq analysis revealed that TFDP1 binds to proximal promoters of canonical histone genes (H1, H2A, H2B, H3, and H4). Depletion of TFDP1 downregulated the expression levels of these histone genes at both RNA and protein levels. Therefore, I concluded that TFDP1 orchestrates chromatin accessibility through the transcriptional regulation of canonical histones. Finally, I examined whether the actual protein binding to chromatin was changed upon depletion of TFDP1. I evaluated the effect by monitoring Cas9 binding to the target sites and found that TFDP1 deletion led to the increased binding of Cas9 protein, which was accompanied with improved genome-editing efficiency. This result implied the potential applicability of manipulating chromatin accessibility to control the efficiency of activities influenced by chromatin states, such as genome-editing and reprogramming.

In summary, this study shed light on the diverse regulatory networks governing the chromatin accessibility landscape and the mechanisms underlying the establishment of chromatin accessibility.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 石井 智子

Title  
論文題目 クロマチンアクセシビリティを制御する新規遺伝子の同定とその作用機序解析

申請者は、「クロマチンアクセシビリティを制御する因子をスクリーニングし、それらの機能解析をおこなうことで、クロマチンアクセシビリティの制御機構を理解すること」を目的とした研究をおこなった。まず、1細胞あたりのクロマチンアクセシビリティの総量を定量することができる ATAC-seq 法の条件検討をおこない、スクリーニングに適した改良型 ATAC-seq 法を樹立した。次に、改良型 ATAC-seq 法と CRISPR ゲノムワイドノックアウトスクリーニングを組み合わせることによって、ヒト1倍体細胞である eHAP 細胞におけるクロマチンアクセシビリティ関連遺伝子を約 100 個同定した。それらの中から、43 個の遺伝子を個別にノックアウトし ATAC-seq 法で解析することで、スクリーニング結果の信頼性が高いことを確認した。さらに、それらの中から 10 個の候補遺伝子を選抜し、各遺伝子のノックアウト細胞を ATAC-seq 法によって解析した。その結果、それぞれの候補遺伝子が特異的なゲノム領域のクロマチンアクセシビリティの制御に関与することを見出し、アクセシビリティの制御ネットワークの一端を明らかにした。

スクリーニングによって同定された遺伝子群の中でも、転写因子 TFDP1 のノックアウトは、クロマチンアクセシビリティを最も効果的に上昇させた。そこで申請者は、TFDP1 によるクロマチンアクセシビリティの制御機構を詳細に解析した。その結果、TFDP1 によるアクセシビリティの制御には、その相互作用パートナーである転写因子群 E2F ファミリーも協調的に関与していることを見出した。また、TFDP1 がヒストン遺伝子群の転写量を直接制御することによって、ゲノム全体のアクセシビリティが調整されることを明らかにした。更に、TFDP1 をノックダウンすることによって、細胞内のクロマチンアクセシビリティを人為的に操作できることを見出し、この操作によって、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集や、山中因子による iPS 細胞リプログラミングの効率を向上させることに成功した。

以上の研究は、クロマチンアクセシビリティの制御機構の一端を明らかにするだけでなく、その応用例を示した初めての研究といえる。これらの研究結果は、国際学術誌 **Nature Genetics** に掲載されることが既に決まっており、国際的にも高い評価を得ている。以上の理由により、審査委員は、本論文が学位の授与に値すると判断した。