

**研究助成 2022 – がん領域 –**  
**研究成果報告書（最終） <概要>**

<b>現 所 属</b>	京都大学大学院医学研究科 先端・国際医学講座 IFOM-KU 国際共同ラボ
<b>氏 名</b>	林 眞理
<b>研究テーマ</b>	独自のレポーター技術を用いた姉妹染色分体融合制御因子の探索と解析
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 研究助成報告として財団ホームページ等に公表するので、その点を留意すること。</li> <li>● 構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果等 1 ページにまとめること。 （図表、写真等の貼付を含む）</li> </ul>	
<p>本研究では、細胞がん化やがん悪性化の原動力としての染色体異常のメカニズム解明を長期的な目的と設定し、特に染色体異常の原因として染色体の融合現象に着目した。染色体融合の人為的な誘導は染色体異常を介して細胞死や染色体倍数化等、様々な異常を引き起こすことが知られている。しかしながら、どのような種類の染色体融合が、どのような状況で生じ、どのような細胞運命を引き起こすのかについて、その詳細は良く分かっていない。</p> <p>正常な染色体末端は、テロメアというタンパク質 DNA の複合体によって保護されている。DNA 複製における末端複製問題により、ヒト体細胞では DNA 複製のたびにテロメア DNA は短くなる。よって生体内の条件でテロメア保護が最初に解かれるタイミングは、DNA 複製の直後である可能性が高い。脱保護された姉妹染色分体の末端は融合する可能性があるため、姉妹染色分体間の融合(SCF: Sister Chromatid Fusion)を抑制するメカニズムが存在しても不思議ではない。しかし SCF を簡便に検出する手法がなかったため、その抑制・促進メカニズムや運命については詳しく分かっていない。</p> <p>そこで本研究では、2つのエクソンに分離した mCitrine 遺伝子を利用して、単一の SCF を任意のタイミングで引き起こし、その細胞を mCitrine でラベルする SCF レポーター細胞・FuVis2 を開発し、SCF に特異的に関与する因子の網羅的スクリーニング・並びに同定された因子の機能解析を目指した。FuVis2 レポーターでは、X 染色体末端に挿入した人工レポーター配列を切断し、mCitrine 発現によって SCF を、mCerulean3 発現によってレポーター配列内での（SCF を伴わない）欠失を、それぞれ識別できる。よって、特定の遺伝子が破壊された際に、mCerulean3 に変化はなく、mCitrine 陽性割合のみが増加した場合、その遺伝子は SCF を特異的に抑制する候補因子となる。</p> <p>dox 依存的に Cas9 を発現する FuVis2 細胞 (FuVis2-iCas9) を単離し、研究協力者（樽本博士・京大医研）が独自に作成したゲノムワイド sgRNA ライブラリーを用いて、集団内の各細胞が平均して 1 sgRNA を獲得する条件を検討した。この条件を用いて、sgRNA を獲得した細胞に対して FuVis2 レポーター配列での SCF および欠失変異を誘導し、mCitrine と mCerulean3 陽性細胞をそれぞれソーティングによって回収した。対象となる mCitrine、mCerulean3 陽性細胞の割合が 1～2% と非常に低かったため、ライブラリーの 100 倍、及び 200 倍の細胞数から回収した DNA サンプルを独立に NGS 解析に供した。得られた結果を解析したところ、mCitrine、mCerulean3 陽性細胞で増減している sgRNA は非常に良く相関することが分かった。一方、mCitrine でのみ有意に増減しているような sgRNA は検出されなかった。</p> <p>この結果を受けて現在は、双方の蛍光陽性細胞で増減した sgRNA を複数リストアップし、個別の sgRNA を用いてスクリーニングの結果の再現性を確認している。また、本研究で用いた FuVis2、及び FuVis2-iCas9 細胞を利用した SCF の運命解析に関する研究を論文として報告した (Yuki Sato &amp; Makoto Hayashi, 2024, <i>LSA</i>)。</p>	

## 研究助成 2022 – がん領域 –

## 研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

現 所 属	京都大学大学院医学研究科 先端・国際医学講座 IFOM-KU 国際共同ラボ
氏 名	林 眞理
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 研究助成報告として財団ホームページ等に公表するので、その点を留意すること。</li> <li>● 欄が足りない場合は増やして記入すること。</li> </ul>	
<b>1. 論文発表実績</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成交付後のものに限る。</li> <li>● 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入すること。なお、著者名は省略せず全てを記入し、自分の名前に<u>下線</u>を引くこと。</li> <li>● 国内外雑誌を問わない。</li> <li>● 印刷中は in press と記入し、投稿中の論文および学会のabstractは含めない。</li> </ul>	
1	Diana Romero-Zamora <sup>#</sup> , Samuel Rogers <sup>#</sup> , Ronnie Ren Jie Low, Scott G. Page, Blake J. E. Lane, Shunya Kosaka, Andrew B. Robinson, Lucy French, Noa Lamm, Fuyuki Ishikawa, <b>Makoto T. Hayashi</b> * and Anthony J. Cesar*; A CPC-shelterin-BTR azix regulates mitotic telomere deprotection; <i>Nature Communications</i> 2025, in press, #Equal contribution, *Co-corresponding authors 査読あり
2	Yuki Sato and <b>Makoto T. Hayashi</b> *; Micronucleus is not a potent inducer of cGAS-STING pathway; <i>Life Science Alliance</i> , 2024, Feb 2; 7(4), DOI: 10.26508/lsa.202302424, *Corresponding author 査読あり
3	Diana Romero-Zamora, and <b>Makoto T. Hayashi</b> *; A non-catalytic N-terminus domain of WRN prevents mitotic telomere deprotection; <i>Scientific Reports</i> , 2023, Jan 12, DOI: 10.1038/s41598-023-27598-0, *Corresponding author 査読あり
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成交付後のものに限る。</li> <li>● 発表学会名、発表者名、演題を記入すること。</li> <li>● 国内外を問わない。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2025年1月29日－1月31日	第42回染色体ワークショップ・第23回核ダイナミクス研究会 Diana Romero-Zamora, Placide Niyonshuti, Samuel Rogers, Anthony J Cesare, ○林 眞理 RECQ 因子による M 期テロメア脱保護の制御機構
2	2024年9月4日－9月6日	日本遺伝学会第96回大会 佐藤祐樹, ○林眞理 染色体融合に起因する微小核は cGAS/STING 経路の強力な誘導因子ではない
3	2024年7月25－26日	第3回細胞分裂研究会 ○林眞理 染色体融合に起因する微小核は cGAS/STING 経路の活性化能が低い
4	2024年5月6－11日	EMBO Workshop Telomere function and evolution in health and disease Yuki Sato, ○ Makoto T Hayashi Micronucleus Derived from Chromosome Fusion Is Not a Potent Inducer of cGAS-STING Pathway
5	2023年12月6日－12月8日	第46回日本分子生物学会年会 Diana Romero, Sam Rogers, Ronnie Ren Jie Low, Alexander Sobinoff, Scott G. Page, 石川冬木, Hilda Pickett, Anthony J. Cesare, ○林眞理 M 期テロメア脱保護の分子機構の解明
6	2023年7月27－28日	第2回細胞分裂研究会 ○林眞理 微小核は自然免疫を活性化するのか？
7	2023年5月2－6日	CSHL Meeting Telomere & Telomerase 2023 Diana Romero-Zamora, Samuel Rogers, Ronnie Ren Jie Low, Alexander Sobinoff, Scott G. Page, Fuyuki Ishikawa, Hilda Pickett, Anthony J. Cesare, and ○Makoto T. Hayashi AURKB-TRF1-BTR Axis Promotes Mitotic Telomere Deprotection by Counteracting the TRF2 Basic Domain (Invited)
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2025年 学会発表	日本細胞生物学会、日本分子生物学会年会
2		
3		
4		

5		
6		
7		