

浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得と  
その次世代への継承における small RNA の役割解析

岡部 恵美子

# 目次

要旨	2
略語	4
序論	5
結果	9
考察	55
材料と方法	59
参考文献	64
謝辞	71

# 要旨

生物は常に様々な環境ストレスに晒されている。これまでに、低用量の環境ストレスがストレス耐性の上昇や寿命の延長など、個体に有益な影響をもたらすことが報告されている。近年、親世代の環境ストレス誘因性のストレス耐性の上昇が、組織間コミュニケーションを介して、子世代にまで受け継がれることが明らかになった。しかし、この組織間コミュニケーションを担う分子や経路の詳細は、未だ明らかになっていない。本研究において私は、線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた解析から、small RNA の組織間コミュニケーションが、浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得とその継承に関与することを見出した。Endogenous small interfering RNA (endo-siRNA) 経路で機能する Argonaute タンパク質を欠損した MAGO12 変異体では、親世代において酸化ストレス耐性の上昇がみられたが、子世代ではみられなかった。一方で、micro RNA (miRNA) 経路で機能する miRNA-processing enzyme *drsh-1* 変異体では、親世代と子世代の両方でストレス耐性の上昇がみられなかった。さらに、germline nuclear RNAi 経路の構成因子である germline nuclear Argonaute HRDE-1、NRDE ファクターおよびその下流で働く H3K9 メチル化酵素 SET-25、SET-32 は、酸化ストレス耐性の継承に必要であることがわかった。以上の結果から、miRNA 経路はストレス耐性の獲得と継承の両方に関与し、endo-siRNA 経路はストレス耐性の継承にのみ関与することが示唆された。次に、組織特異的な解析を用いて、endo-siRNA と miRNA の生成に関与する Dicer DCR-1、miRNA の生成に関与する DRSH-1、small RNA の細胞内への取り込みに必要な膜チャネル SID-1 が機能する組織を同定した。その結果、ストレス耐性の獲得には神経の DCR-1 と DRSH-1、並びに、腸の SID-1 が必要であり、ストレス耐性の継承には腸の DCR-1 と DRSH-1、並びに、生殖腺の SID-1 が必要であることがわか

った。さらに、子世代のストレス耐性の上昇には、子世代の DCR-1、DRSH-1、SID-1 がそれぞれ必要であることが明らかになった。以上の結果から、浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得とその継承において、次のようなモデルが考えられる。(1)環境の変化に応じ、神経で生成された miRNA が腸に伝達されることで親世代のストレス耐性が上昇し、(2)腸で生成された miRNA が生殖腺へと伝達されたのち、germline nuclear RNAi 経路によるヒストン修飾を介して、ストレス耐性が親から子へと伝えられる。(3)small RNA の組織間コミュニケーションにより子世代のストレス耐性が上昇する。本研究より、浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得および継承において、機能が異なる 2 種類の RNA 経路が担う組織間コミュニケーションのメカニズムの一端が明らかになった。

# 略語表

cDNA: complementary DNA

dsRNA: double-stranded RNA

GFP: green fluorescent protein

NGM: normal growth medium

NLS: nuclear localization signal

Osm: osmotic stress

PCR: polymerase chain reaction

RNAi: RNA interference

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

L4: fourth larvae

WT: wild type

# 序論

生物は、絶えず変化し続ける環境に適応するため、多様な生体防御機構を備えている。通常の生育環境とは異なるストレス環境下におかれると、生物はストレス応答機構を活性化することで個体の恒常性を維持する。ストレスの種類に応じて、固有のストレス応答が誘導されることから、ストレス応答には適切かつ厳密な遺伝子発現制御が必要である。これまでに、様々な環境ストレスが個体の遺伝子パターンに変化を与えることで、寿命延長やストレス耐性の上昇といった、個体の表現型にまで影響を及ぼすことが多数報告されている(Cypser and Johnson, 2002; Gems and Partridge, 2008; Kumsta *et al.*, 2017)。さらに近年では、環境ストレスによって誘導された表現型の変化が、その子孫にまで受け継がれることが報告されている。例として、線虫の発生過程において低用量の環境ストレスに晒したことによるストレス耐性の上昇が、非ストレス条件下で育った子孫へと継承されることを示す報告が挙げられる(Kishimoto *et al.*, 2017)。そして、これら環境ストレス誘因性の形質の次世代への継承には、エピジェネティクスな変化が関与していることが示唆されつつある(Gammon *et al.*, 2017; Kishimoto *et al.*, 2017; Klosin *et al.*, 2017)。

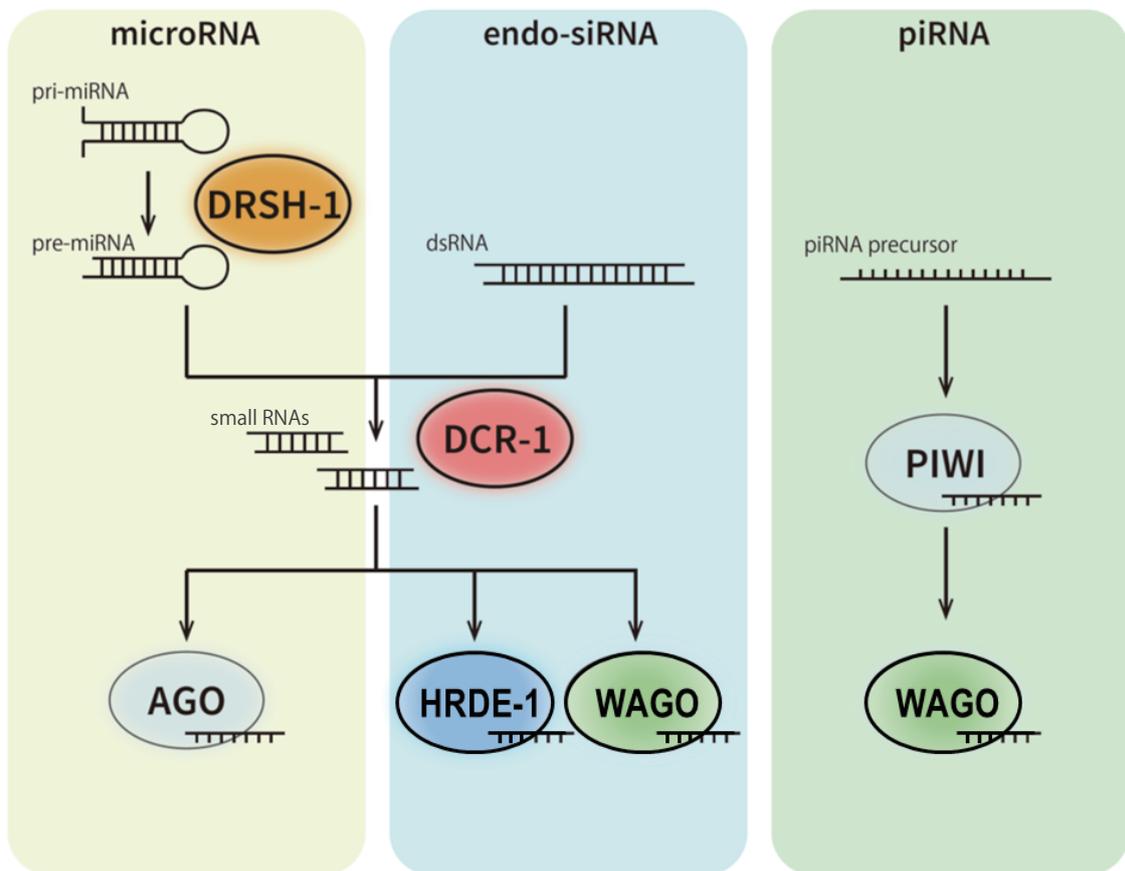
エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列の変化に依らず、DNA やヒストンへの後天的な化学修飾によって遺伝子発現が制御される仕組みである。メチル化やアセチル化など化学修飾には様々な種類があり、修飾部位も多岐にわたる。この多様性が個体発生や細胞分化をはじめとする、多くの生命現象を生み出している(González-Aguilera *et al.*, 2014; Atlasi and Stunnenberg., 2017)。主要なエピジェネティクス制御機構として、DNA のメチル化、ヒストン修飾、non-coding RNA (ncRNA)が知られている。ncRNA とは、タンパク質をコードしない機能性 RNA の総称であり、サイズによって約 20~30

bp 程度の小分子 RNA (small RNA) と、数百から数十 kbp に及ぶ長鎖 ncRNA (lncRNA) に分けられる。Small RNA は、さらに PIWI-interacting RNA (piRNA)、micro RNA (miRNA)、endogenous small interfering RNA (endo-siRNA) の 3 クラスに分類され、機能する時期や組織に違いがみられる (Hoogstrate *et al.*, 2014) (Figure 1)。これらの small RNA は、Argonaute タンパク質に取り込まれ、RNA-induced silencing complex (RISC) を形成したのち、small RNA と相補的な mRNA を選択的に認識し、標的の mRNA の分解や翻訳の阻害を引き起こすことで、遺伝子の発現を制御する (Kim *et al.*, 2008)。先に述べたように、環境ストレスなどの外界の刺激に応じてエピゲノムが変化し、親世代および次世代の形質にまで影響することから、エピゲノムは親が経験する環境と子孫の形質とを繋ぐインターフェースであると考えられる。特に、small RNA は配列依存的に遺伝子発現を制御することから、世代間の厳密な遺伝子調節が必要である形質の継承において、親から子への情報伝達を担う候補分子である可能性がある。しかしながら、環境ストレスによって誘導された形質が、small RNA によってどのように子孫へ伝えられるかの詳細なメカニズムはわかっていない。

組織間の相互作用は、環境適応やストレス応答といった個体の恒常性維持に重要であることが報告されている (van Oosten-Hawle *et al.*, 2013; Tatum *et al.*, 2015)。近年、環境要因および遺伝的操作によって誘導されたストレス耐性の継承に、体細胞組織と生殖腺間の相互作用が重要であることが明らかになった (Kishimoto *et al.*, 2017; Nono *et al.*, 2020)。このことから、世代間だけではなく組織間の情報伝達を担う分子の存在が示唆されるが、ストレス耐性の継承における組織間情報伝達のメカニズムは不明な点が多い。

本研究では、低用量の浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得と継承における small RNA の機能解析を行った。その結果、miRNA 経路が酸化ストレス耐性の獲得および継承に関与する一方で、endo-siRNA 経路は酸化ストレス耐性の継承にのみ関与す

ることを見出した。さらに、ストレス耐性の獲得と継承において、small RNA の神経-腸-生殖腺間の組織間コミュニケーションが必要であることが明らかになった。



**Figure 1. Small RNA 経路の概略図**

Small RNA は、micro RNA (miRNA)、endogenous small interfering RNA (endo-siRNA)、PIWI-interacting RNA (piRNA) の 3 クラスに分類され、それぞれ機能する時期や組織に違いがみられる。これらの small RNA は、Argonaute タンパク質に取り込まれ RNA-induced silencing complex (RISC) を形成したのち、small RNA と相補的な mRNA を認識し mRNA の分解や翻訳を阻害することで、遺伝子発現を制御する。

# 結果

## 体細胞組織で機能する small RNA は浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得とその継承に関与する

先行研究において、環境ストレス誘導性のストレス耐性の継承に、体細胞組織と生殖腺間の相互作用が必要であることが報告されている(Kishimoto *et al.*, 2017)。体細胞組織で機能する endo-siRNA および miRNA が環境ストレス誘導性のストレス耐性の継承に関与するかを検討するため、endo-siRNA と miRNA の両方の生成に必要な RNase Dicer/DCR-1(Duchaine *et al.*, 2006; Yigit *et al.*, 2006)について調べることにした(Figure 1)。線虫に与える低用量刺激として、高浸透圧ストレスを用い、親世代の線虫を卵から day 2 adult ステージまでの 4 日間、通常量より多い塩化ナトリウム (NaCl) を含む NGM プレート上で飼育したのち(Figure 2A)、酸化ストレス耐性を測定した。酸化ストレス耐性は、酸化ストレス源である過酸化水素 ( $H_2O_2$ )に対する生存率を測定することで評価した。子世代の線虫は、親世代から卵を回収し、非ストレス存在下で 4 日間飼育したのち(Figure 2A)、酸化ストレス耐性を測定した。野生型の線虫は、ストレスを与えた親世代で酸化ストレス耐性の上昇がみられた(Figure 2B)。一方、*dcr-1(ok247)* ホモ変異体ではストレス耐性の上昇はみられなかった(Figure 2B)。*dcr-1(ok247)* ホモ変異体は不妊であるため、子世代の線虫は得られなかった。そこで、親世代で *dcr-1(ok247)* ヘテロ変異体を用いることで、子世代を得ることとした。野生型の線虫は、親世代およびその子世代で酸化ストレス耐性の上昇がみられた(Figure 2C)。一方、*dcr-1* 変異体(*ok247*)は、親世代のヘテロ変異体および子世代のホモ変異体の両方で、ストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 2C)。さらに、不妊の表現型を示さない *dcr-1* 変異体(*tm12491*)についてもストレス耐性を測定したところ、親世代と子世代

の両方でストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 2D)。したがって、体細胞組織で機能する endo-siRNA と miRNA は、浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得および継承に必要であることが示唆された。

### **浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の継承に endo-siRNA 経路が必要である**

ストレス耐性の獲得とその継承における endo-siRNA と miRNA の役割をより詳しく調べるため、endo-siRNA がストレス耐性の獲得と継承のどちらに必要かを検討した。線虫には 27 種の Argonaute タンパク質があり、その中の 12 種の Argonaute は WAGO タンパク質と呼ばれ、endo-siRNA と共に機能することで標的遺伝子の発現を抑制することが知られている(Yigit *et al.*, 2006; Grishok *et al.*, 2001; Montgomery *et al.*, 2012)。そこで、全ての WAGO 遺伝子が欠損しており、endo-siRNA による RNAi 干渉が誘導されないことが報告されている MAGO12 変異体(Gu *et al.*, 2009)について、ストレス耐性を調べた。その結果、MAGO12 変異体は、親世代ではストレス耐性の上昇がみられたが、子世代ではみられなかった(Figure 3)。以上のことから、endo-siRNA 経路は浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の継承に必要であることが示された。

### **浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得とその継承に miRNA 経路が必要である**

Endo-siRNA 経路と miRNA 経路の両方で機能する DCR-1 がストレス耐性の獲得に関与する一方で、endo-siRNA 経路のみで働く WAGO がストレス耐性の継承に関与することから、miRNA 経路はストレス耐性の獲得に必要ではないかと考えた。そこで、miRNA の生成機構の上流で働く miRNA-processing enzyme Drosha/DRSH-1 の変異体について、ストレス耐性を測定した(Figure 1)。ストレスを与えた親世代の *drsh-1* ホモ変異体は、ストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 4A)。*dcr-1(ok247)*変異体と同様に *drsh-1* ホモ変異体も不妊であることから、親世代で *drsh-1* ヘテロ変異体を用い

ることで子世代を得た。その結果、親世代のヘテロ変異体および子世代のホモ変異体の両方でストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 4B)。以上のことから、miRNA 経路は浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得および継承に必要であることが分かった。

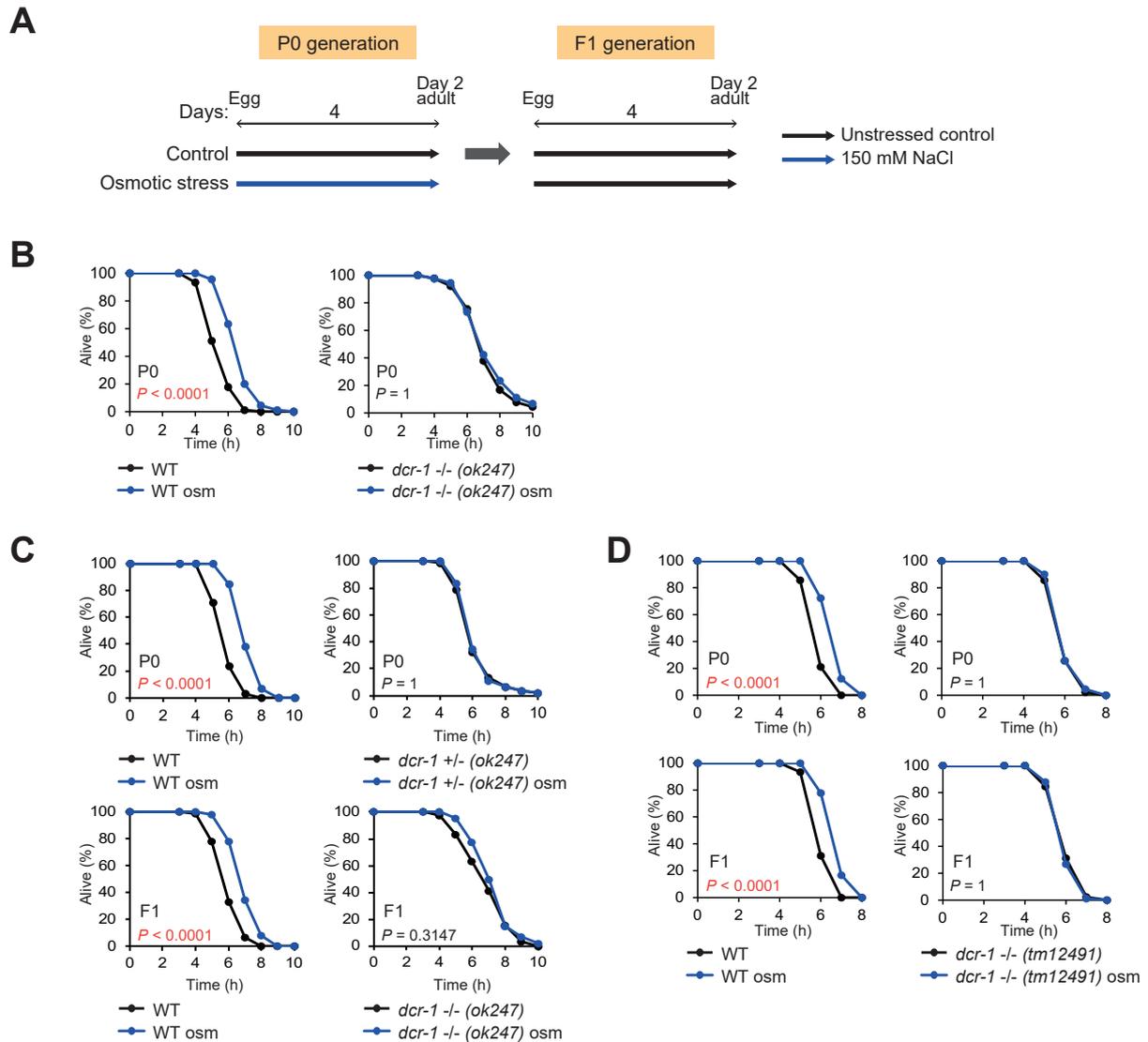
### **DCR-1 と DRSH-1 は、不妊によるストレス耐性の上昇ではなく、浸透圧刺激によるストレス耐性の上昇に関与する**

これまでの結果から、miRNA は酸化ストレス耐性の獲得と継承の両方に必要であり、endo-siRNA はストレス耐性の継承にのみ必要であることが示唆された。しかしながら、ストレスを与えていないコントロールの *dcr-1 (ok247)* ホモ変異体と *drsh-1* ホモ変異体は、コントロールの野生型に比べて、高いストレス耐性を示した(Figure 2B, 4A)。不妊ではない *dcr-1* 変異体(*tm12491*)は、コントロールにおいてストレス耐性の上昇がみられないこと(Figure 2D)、さらに不妊は寿命の延長や病原体の感染に対するストレス耐性の上昇に関与することから(Arantes-Oliveira *et al.*, 2002; TeKippe & Aballay, 2010)、*dcr-1(ok247)* ホモ変異体と *drsh-1* ホモ変異体のコントロールでのストレス耐性の上昇は、不妊が原因であると推測される。したがって、これらの変異体でストレス耐性の上昇がみられないのは、既にコントロールで高いストレス耐性を示していることにより、浸透圧刺激に対する反応がみられなくなっている可能性が考えられる。そこで、親世代において発生完了後の L4 ステージから 2 日間 *dcr-1* または *drsh-1* をノックダウンし、不妊にならない条件でストレス耐性を測定した(Figure 5A)。L4 ステージから *dcr-1* および *drsh-1* をノックダウンした線虫は、コントロールのストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 5B, C)。さらに、これらの線虫は不妊ではないにもかかわらず、浸透圧刺激を与えた親世代およびその子世代において、ストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 5B, C)。以上の結果から、DCR-1 と DRSH-1 は不妊によるストレス耐

性の上昇ではなく、浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の上昇に関与することが示された。

### **子世代のストレス耐性の上昇に endo-siRNA 経路および miRNA 経路が必要である**

次に、endo-siRNA 経路と miRNA 経路が子世代のストレス耐性の上昇に必要であるか検討した。浸透圧刺激を与えた親から卵を回収し、子世代から *dcr-1* および *drsh-1* をノックダウンした。その結果、子世代での *dcr-1* および *drsh-1* のノックダウンの両方で、ストレス耐性の上昇が抑制された(Figure 6)。よって、子世代の酸化ストレス耐性の上昇に、endo-siRNA と miRNA の両方の経路、もしくは miRNA 経路のみ必要であることが示唆された。



## Figure 2. 体細胞組織で機能する small RNA は酸化ストレス耐性の獲得とその継承に関与する

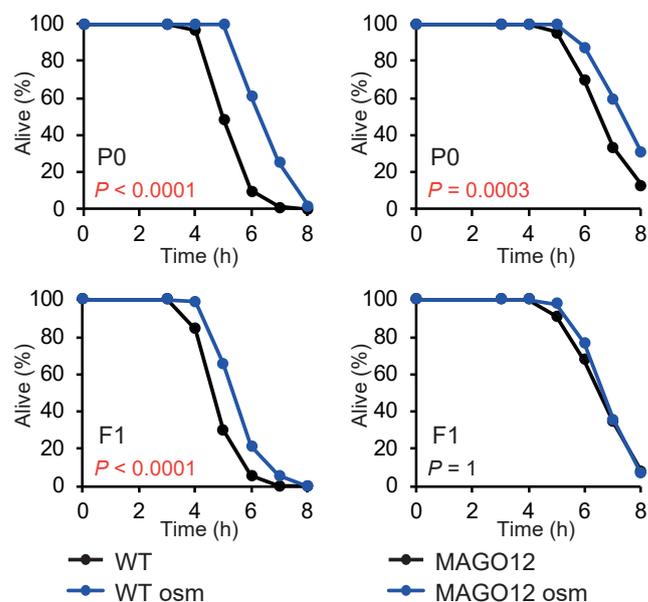
(A) 飼育方法の模式図。親世代は発生過程で浸透圧ストレス (NaCl) を与えて飼育する。その親世代から産まれた子世代は非ストレス条件下で飼育する。

(B) 野生型 (左) と *dcr-1(ok247)* ホモ変異体 (右) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  2.0 mM) を示す。

(C) 親世代の野生型 (左上) と *dcr-1(ok247)* ヘテロ変異体 (右上) 及び子世代の野生型 (左下) と *dcr-1(ok247)* ホモ変異体 (右下) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  2.0 mM) を示す。ホモ変異体とヘテロ変異体は GFP の発現により区別する。

(D) 野生型 (左) と *dcr-1(tm12491)* 変異体 (右) の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.8 mM) を示す。

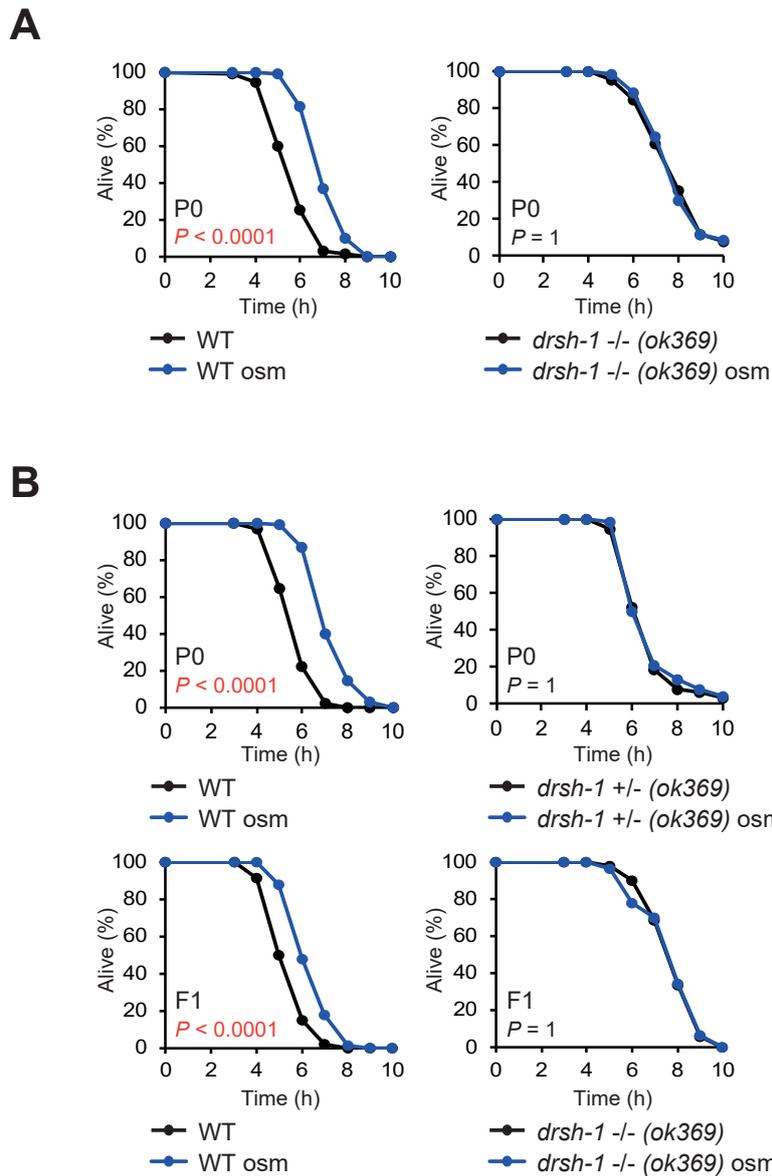
3 回分の実験を統合したグラフを示す。p 値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータは Table 1 に示す。



### Figure 3. 酸化ストレス耐性の継承に endo-siRNA 経路が必要である

野生型（左）と MAGO12 変異体（右）の親世代（上段）および子世代（下段）の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.8 mM) を示す。

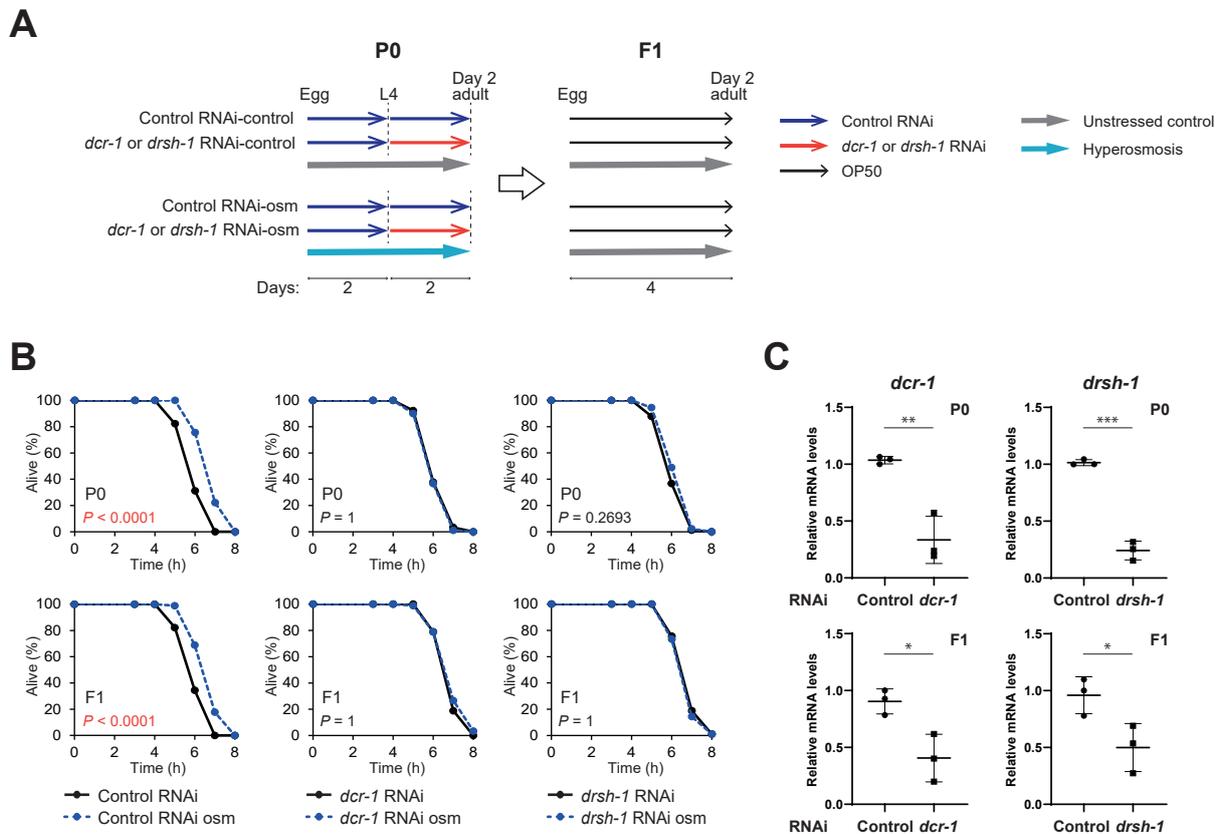
3 回分の実験を統合したグラフを示す。p 値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータは Table 2 に示す。



**Figure 4. 酸化ストレス耐性の獲得と継承に miRNA 経路が必要である**

(A) 野生型 (左) と *drsh-1* ホモ変異体 (右) の酸化ストレス耐性 ( $H_2O_2$  2.0 mM) を示す。  
 (B) 親世代の野生型 (左上) と *drsh-1* ヘテロ変異体 (右上) 及び子世代の野生型 (左下) と *drsh-1* ホモ変異体 (右下) の酸化ストレス耐性 ( $H_2O_2$  2.0 mM) を示す。ホモ変異体とヘテロ変異体は GFP の発現により区別する。

3 回分の実験を統合したグラフを示す。p 値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータは Table 3 に示す。

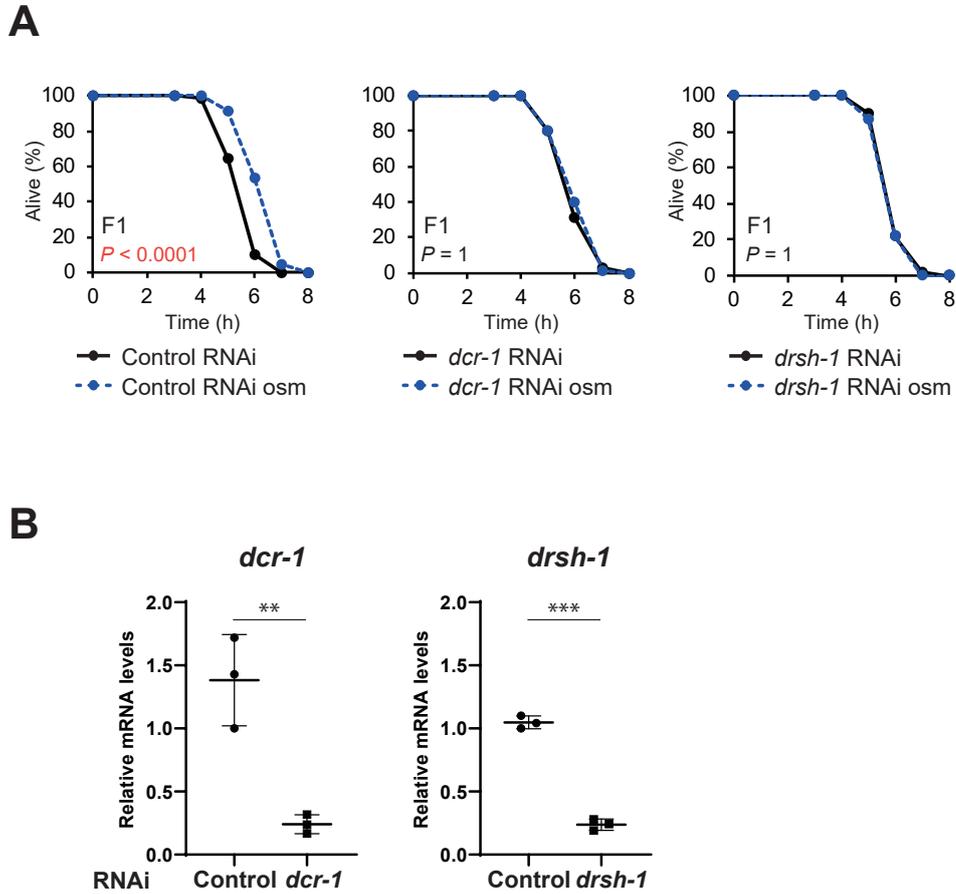


## Figure 5. DCR-1 と DRSH-1 は不妊によるストレス耐性の上昇ではなく浸透圧刺激によるストレス耐性の上昇に関与する

(A) 実験方法の概要図。親世代は卵から4日間浸透圧ストレスを与え、発生完了後のL4ステージから2日間RNAi法により、目的の遺伝子をノックダウンする。子世代は非ストレス存在下で飼育する。

(B) 親世代において control RNAi (左)、*dcr-1* RNAi (中央)、*drsh-1* RNAi (右) を行った場合の親世代(上段)および子世代(下段)の酸化ストレス耐性( $H_2O_2$  2.0 mM)を示す。3回分の実験を統合したグラフを示す。 $p$ 値はlog-rank検定により算出しBonferroni法で補正した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータはTable 4に示す。

(C) 親世代でL4ステージから2日間、*dcr-1*または*drsh-1*をノックダウンした場合の、親世代(上段)および子世代(下段)での*dcr-1*(左)と*drsh-1*(右)の発現量を示す。エラーバーは標準偏差を表す。 $p$ 値はunpaired Student's  $t$ -testにより算出した。\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ 。



## Figure 6. 子世代のストレス耐性の上昇に endo-siRNA 機構および miRNA 機構が必要である

(A) ストレスを与えた親から産まれた子世代において、control RNAi (左)、*dcr-1* RNAi (中央)、*drsh-1* RNAi (右) を行った場合の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  2.0 mM) を示す。2 回分の実験を統合したグラフを示す。 $p$  値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータは Table 5 に示す。

(B) *dcr-1* または *drsh-1* をノックダウンした場合の、*dcr-1* (左) と *drsh-1* (右) の発現量を示す。エラーバーは標準偏差を表す。 $p$  値は unpaired Student' s *t*-test により算出した。\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ 。

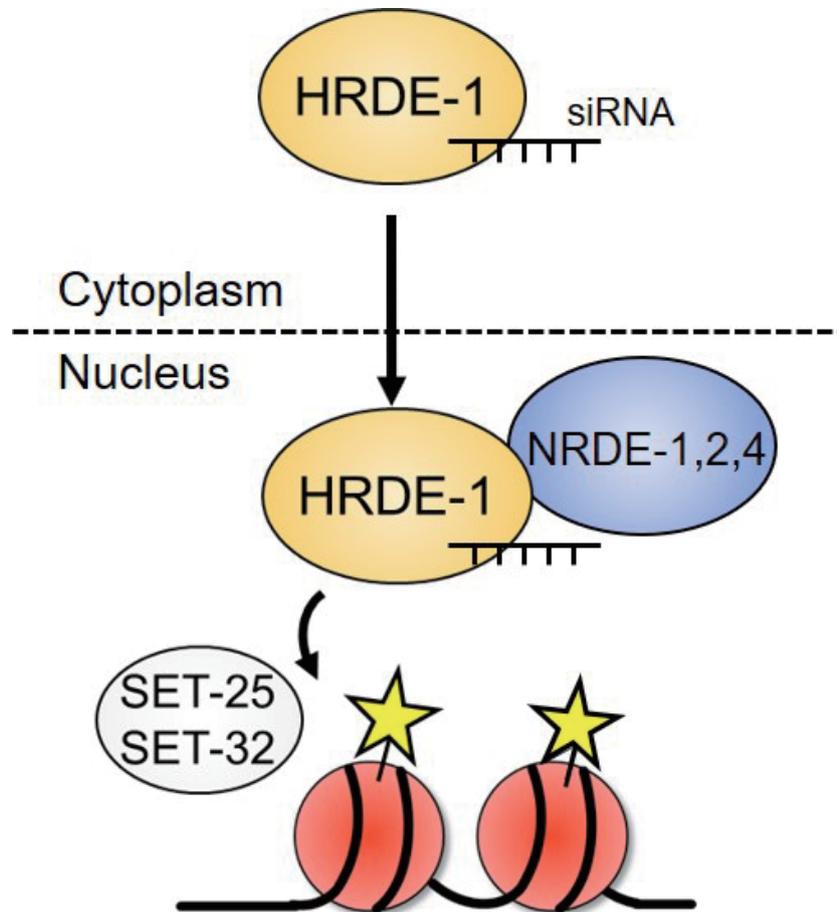
## Germline nuclear Argonaute HRDE-1 および NRDE ファクターはストレス耐性の継承に関与する

これまでの結果から、endo-siRNA 経路は浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の継承に関与することが示された。生殖腺は親から子へ形質を伝える上で重要な組織であることから、私は endo-siRNA の生殖腺における機能がストレス耐性の継承に重要なのではないかと考えた。この可能性を検討するため、生殖腺特異的に機能する germline nuclear RNAi 経路に焦点を当てた。Germline nuclear RNAi 経路では、WAGO の 1 つである生殖腺特異的な Argonaute HRDE-1 が、細胞質で siRNA と結合すると核へと移動し、NRDE ファクター(NRDE-1, 2, 4)に依存して標的遺伝子の転写を抑制することが知られている(Ashe *et al.*, 2012; Buckley *et al.*, 2012; Guang *et al.*, 2010; Burkhart *et al.*, 2011) (Figure 7)。そこで、HRDE-1 および NRDE ファクターが、ストレス耐性の継承に関与するかを検討した。*hrde-1* 変異体は、親世代ではストレス耐性の上昇がみられたが、子世代ではストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 8A)。*hrde-1* 変異体においても、コントロールのストレス耐性の上昇がみられたので、発生完了後の L4 ステージから *hrde-1* をノックダウンし、ストレス耐性を測定した。*hrde-1* のノックダウンは、*hrde-1* 変異体の場合と同様、親世代においてストレス耐性の上昇がみられたが、子世代では耐性上昇がみられなかった(Figure 8B, C)。さらに、*nrde-1*、*nrde-2*、*nrde-4* の変異体の親世代ではストレス耐性の上昇がみられたが、子世代ではストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 8D)。以上の結果から、HRDE-1 と NRDE ファクターは、酸化ストレス耐性の継承に必要であることがわかった。

## H3K9 メチル化酵素 SET-25 および SET-32 はストレス耐性の継承に必要である

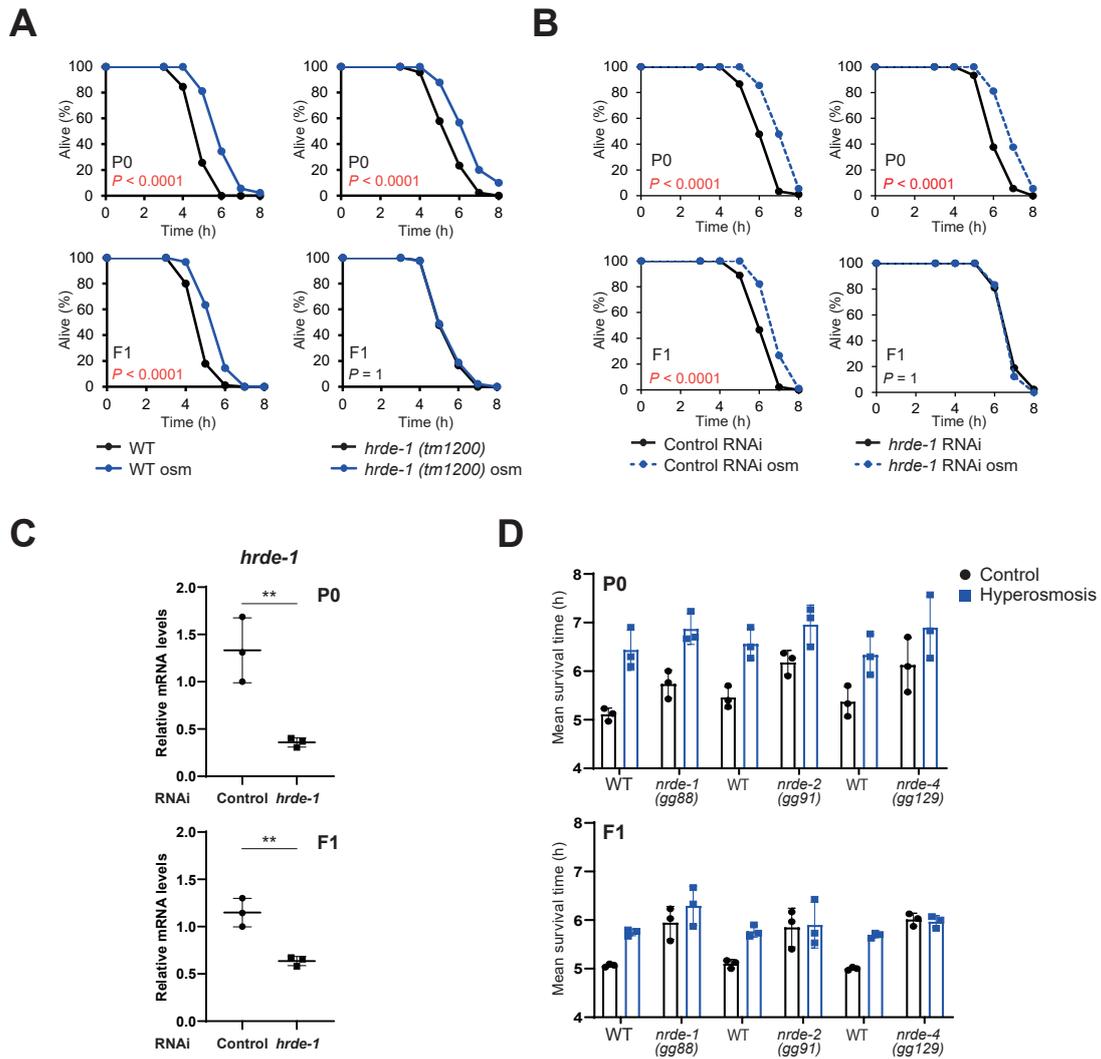
Germline nuclear RNAi 経路において、HRDE-1 と NRDE ファクターは、RNA ポリメラーゼ II の阻害や、ヒストンメチル化酵素 SET-25 および SET-32 による H3K9 の

メチル化を介して、標的遺伝子の転写を抑制する(Spracklin *et al.*, 2017; Woodhouse *et al.*, 2018; Kalinava *et al.*, 2018) (Figure 7)。そこで、SET-25 および SET-32 がストレス耐性の継承に関与するかを検討した。*set-25* および *set-32* 変異体において、親世代ではストレス耐性の上昇がみられたが、子世代ではストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 9A, B)。さらに、*set-25;set-32* 二重変異体においても、親世代ではストレス耐性の上昇がみられたが、子世代ではストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 9C)。したがって、H3K9 メチル化酵素 SET-25 および SET-32 は、酸化ストレス耐性の継承に必要であることが示唆された。



**Figure 7. Germline nuclear RNAi 経路の概略図**

Germline nuclear Argonaute HRDE-1 は、細胞質で siRNA と結合すると核へと移動し、NRDE-1、NRDE-2、NRDE-4 に依存して、RNA ポリメラーゼIIの阻害やヒストン H3K9 のトリメチル化を促進することで、標的遺伝子の発現を抑制する。H3K9 のトリメチル化は、H3K9 メチル化酵素 SET-25、SET-32 によって行われる。



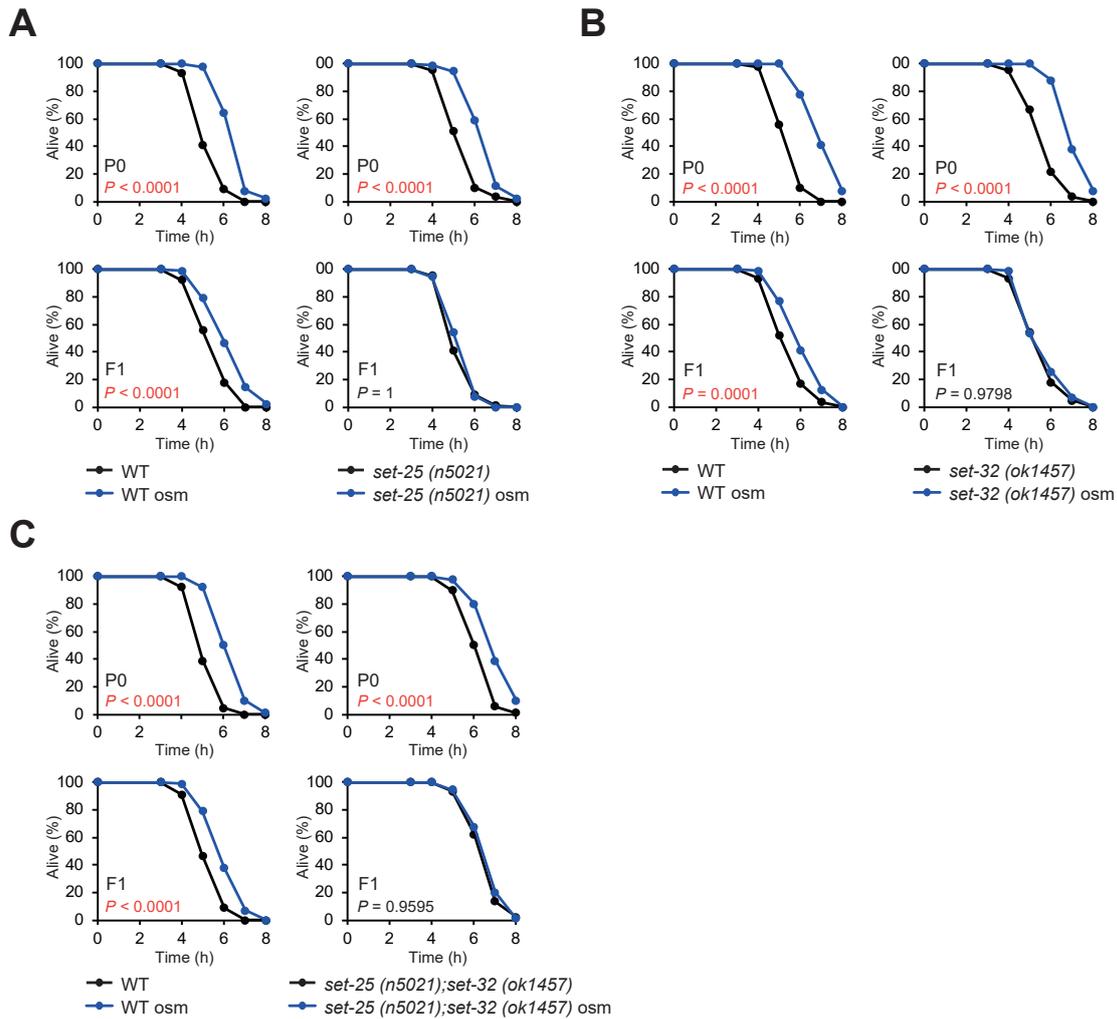
## Figure 8. Germline nuclear Argonaute HRDE-1 および NRDE ファクターはストレス耐性の継承に必要である

(A) 野生型 (左) と *hrde-1* 変異体 (右) の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $H_2O_2$  1.8 mM) を示す。

(B) 親世代において L4 ステージから 2 日間、control RNAi (左)、*hrde-1* RNAi (右) を行った場合の、親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $H_2O_2$  2.0 mM) を示す。3 回分の実験を統合したグラフを示す。生存曲線の  $p$  値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータは Table 6 に示す。

(C) 親世代で L4 ステージから 2 日間、*hrde-1* をノックダウンした場合の、親世代および子世代での *hrde-1* の発現量を示す。エラーバーは標準偏差を表す。 $p$  値は unpaired Student's  $t$ -test により算出した。\*\* $p < 0.01$ 。

(D) HRDE-1 と共に機能する NRDE-1,2,4 の平均生存時間を示す。エラーバーは標準偏差を示す。詳細なデータは Table 6 に示す。



## Figure 9. H3K9 メチル化酵素 SET-25 および SET-32 はストレス耐性の継承に必要である

(A) 野生型 (左) と *set-25* 変異体 (右) の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.8 mM) を示す。

(B) 野生型 (左) と *set-32* 変異体 (右) の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.8 mM) を示す。

(C) 野生型 (左) と *set-25;set-32* 変異体 (右) の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.8 mM) を示す。

3 回分の実験を統合したグラフを示す。p 値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータは Table 7 に示す。

## 親世代のストレス耐性の獲得と継承に small RNA の組織間伝達が必要である

先行研究から、環境ストレス誘導性のストレス耐性の継承に、体細胞組織と生殖腺間の相互作用が必要であることが明らかにされている(Kishimoto *et al.*, 2017)。線虫において、外因性 dsRNA の特定の組織への導入は、dsRNA を導入していない組織に RNA サイレンシングを誘導できること(Jose *et al.*, 2009)、さらに、外因性のサイレンシングと内因性のサイレンシングは、共通のメカニズムを持つことが知られている(Yigit *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006)。以上のことから、small RNA が獲得したストレス耐性情報の組織間および世代間のシグナル伝達を担っているのではないかと考えた。dsRNA の細胞内への取り込みには、dsRNA の膜チャネル SID-1 が必要であることから(Winston *et al.*, 2002)、SID-1 がストレス耐性の継承に関与するかを検討した。*sid-1* 変異体は、親世代、子世代共にストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 10A)。このことは、small RNA の組織間伝達が、ストレス耐性の獲得および継承に必要であることを示唆している。

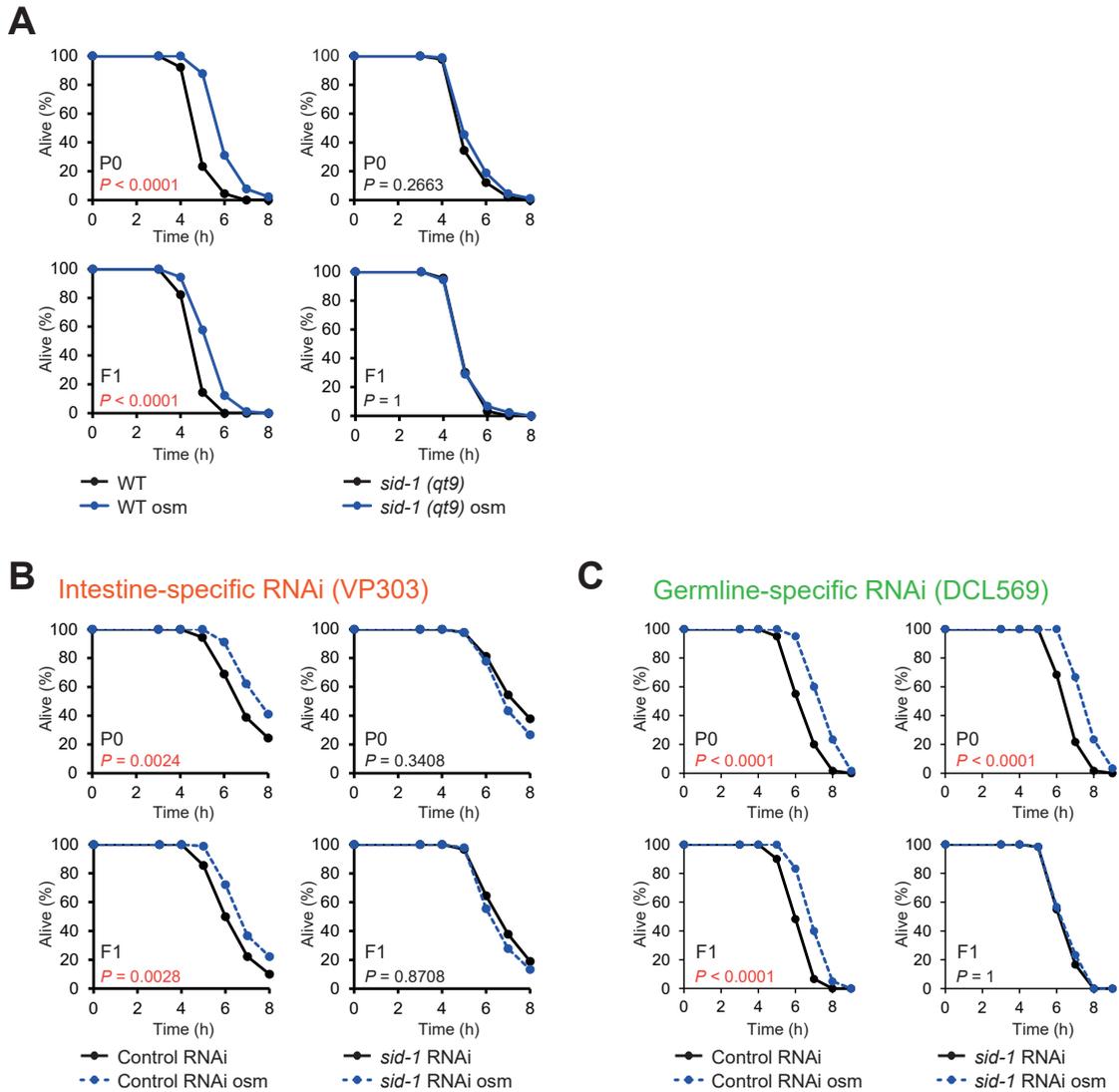
次に、ストレス耐性の獲得および継承において、どの組織で SID-1 が機能することが重要なのかについて解析を行った。そこで、SID-1 が発現している腸、生殖腺で、それぞれ組織特異的にノックダウンが可能な変異体(VP303、DCL569) (Espelt *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2019)を使用し、ストレスを与える親世代において *sid-1* をノックダウンした場合のストレス耐性を測定した。まず、腸組織特異的に *sid-1* をノックダウンしたところ、親世代および子世代でストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 10B)。一方で、生殖腺特異的ノックダウンでは、親世代でストレス耐性の上昇がみられたが、子世代ではストレス耐性の上昇が抑制された(Figure 10C)。以上の結果から、親世代のストレス耐性の獲得には腸組織での SID-1 の機能が、ストレス耐性の継承には生殖腺での SID-1 の機能が必要であることが示唆された。この結果は、先で述べた、ストレス耐性の継承に、親世代の germline nuclear RNAi 経路が必要であるという考えと矛盾しな

い。

### 子世代のストレス耐性の上昇に small RNA の組織間伝達が必要である

親世代のストレス耐性の獲得と継承に、small RNA の組織間伝達が重要であることが明らかになったので、子世代のストレス耐性の上昇においても small RNA の組織間伝達が必要であるかを検討した。ストレスを与えた親から産まれた子世代で *sid-1* を全身でノックダウンしたところ、ストレス耐性の上昇が抑制された(Figure 11A, B)。よって、子世代のストレス耐性の上昇においても、small RNA の組織間伝達が必要であることが示された。

次に、子世代のストレス耐性の上昇において、SID-1 が機能する組織の解析を行った。子世代の腸組織で *sid-1* をノックダウンしたところ、ストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 11C)。興味深いことに、生殖腺特異的な *sid-1* のノックダウンにおいてもストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 11D)。したがって、腸だけではなく生殖腺での SID-1 の機能が、子世代のストレス耐性の上昇に関与していることが明らかになった。以上の結果から、small RNA の組織間伝達は、子世代におけるストレス耐性の維持に必要であることが示された。



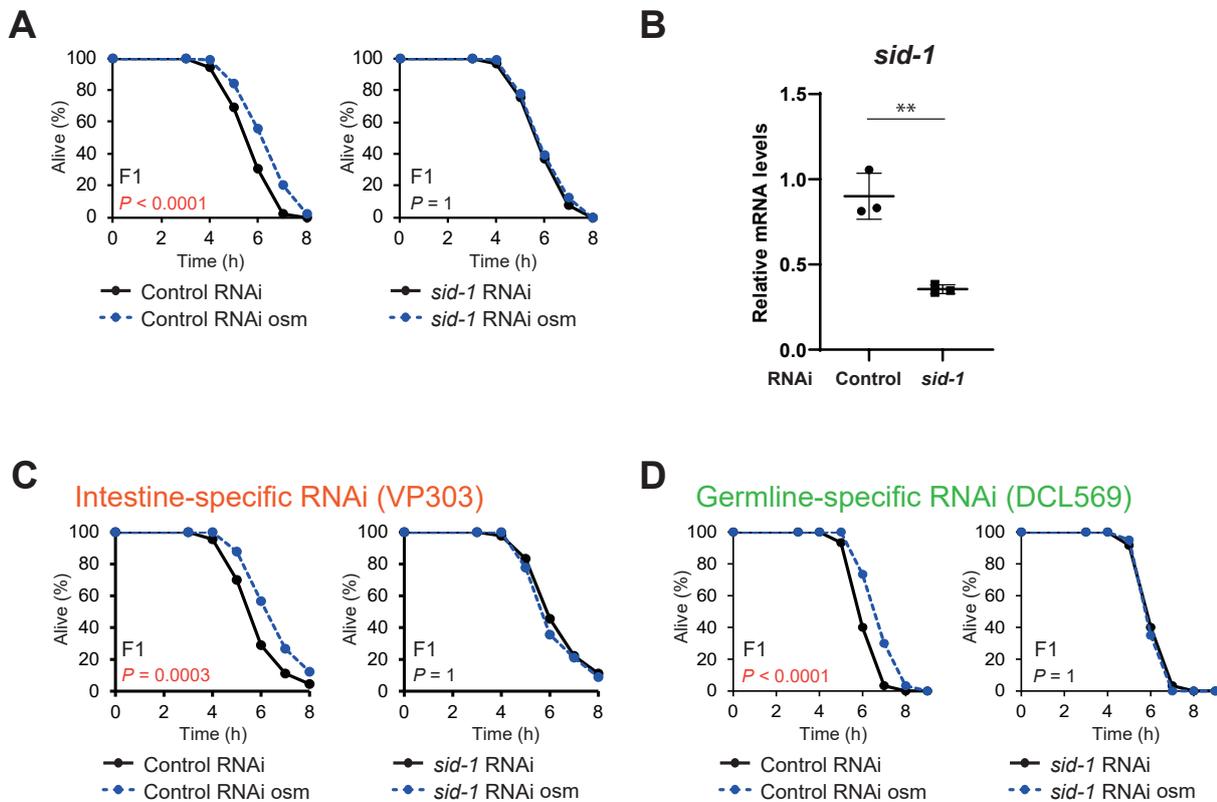
## Figure 10. 親世代のストレス耐性の獲得とその継承に small RNA の組織間輸送が関与する

(A) 野生型 (左) と *sid-1* 変異体 (右) の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.8 mM) を示す。

(B) 親世代で腸組織特異的に control RNAi (左)、*sid-1* RNAi (右) を行った場合の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  2.5 mM) を示す。

(C) 親世代で生殖腺特異的に control RNAi (左)、*sid-1* RNAi (右) を行った場合の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  2.0 mM) を示す。

2 または 3 回分の実験を統合したグラフを示す。p 値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータは Table 8 に示す。



## Figure 11. 子世代のストレス耐性の上昇に small RNA の組織間輸送が関与する

(A) ストレスを与えた親から産まれた子世代において、全身で control RNAi (左)、*sid-1* RNAi (右) を行った場合の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  2.0 mM) を示す。3 回分の実験を統合したグラフを示す。

(B) *sid-1* を全身でノックダウンした場合の、*sid-1* の発現量を示す。エラーバーは標準偏差を表す。 $p$  値は unpaired Student's *t*-test により算出した。\*\* $p < 0.01$ 。

(C) 子世代で腸組織特異的に control RNAi (左)、*sid-1* RNAi (右) を行った場合の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  2.5 mM) を示す。3 回分の実験を統合したグラフを示す。

(D) 子世代で生殖腺特異的に control RNAi (左)、*sid-1* RNAi (右) を行った場合の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  2.0 mM) を示す。2 回分の実験を統合したグラフを示す。

生存曲線の  $p$  値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータは Table 9 に示す。

## ストレス耐性の獲得と継承において DCR-1 と DRSH-1 は体細胞組織で機能する

これまでの結果から、浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得と継承に、small RNA の組織間伝達が必要であることが示唆された。次に、ストレス耐性の獲得および継承において、どの組織で small RNA が生成されることが重要であるか調べた。初めに、CRISPR/Cas9 システムを使用して(Shen *et al.*, 2014)、endo-siRNA および miRNA の生成に必要な DCR-1、miRNA の生成のみに必要な DRSH-1 を、体細胞組織でそれぞれノックアウトした。その結果、*dcr-1* の体細胞組織特異的ノックアウトは、親世代のストレス耐性の上昇を抑制した(Figure 12A)。*drsh-1* の体細胞組織特異的ノックアウトは、統計的に有意ではあるが、親世代のストレス耐性の上昇を概ね抑制した(Figure 12B)。また、*dcr-1* および *drsh-1* の体細胞組織特異的ノックアウトは共に、子世代のストレス耐性の上昇を抑制した(Figure 12)。よって、体細胞組織で small RNA が生成されることが、ストレス耐性の獲得と継承に必要であることが明らかになった。

## ストレス耐性の獲得および継承に神経と腸の DCR-1 および DRSH-1 の機能が必要である

上記から、ストレス耐性の獲得に DCR-1 と DRSH-1 の体細胞組織での機能が必要であることが示唆された。線虫は、周囲の浸透圧変化を、化学走性や浸透圧回避に必要な感覚ニューロンによって感知している(Bargmann, 2006)。さらに、線虫の腸組織は排泄、分泌機能を有しており、腸に発現する膜内在タンパク質アクアポリンが、浸透圧調整に重要であることが知られている(Igual *et al.*, 2017)。以上のことから、神経および腸の DCR-1、DRSH-1 の機能がストレス耐性の獲得に関与しているのではないかと考えた。そこで、CRISPR/Cas9 システムを使用して、神経および腸で DCR-1 と DRSH-1 をそれぞれノックアウトした。ノックアウトの組織特異性の確認には、GFP の蛍光回復により評価する方法を利用した。この方法では、Cas9 の標的配列を内部に有する GFP

(wGxxFP)を発現させ、Cas9による標的配列の切断に伴うGFPの再構築によって、ノックアウトされた細胞を確認できる(Mashiko *et al.*, 2013)。Cas9を神経および腸で導入すると、神経と腸の核内でそれぞれGFPの発現が確認できた(Figure 13A)。このことは、目的の組織特異的に遺伝子がノックアウトされていることを示している。

まず、*dcr-1*を神経特異的にノックアウトしたところ、親世代では統計的に有意ではあるが、ストレス耐性の上昇が部分的に抑制された(Figure 13B)。子世代のノックアウト個体では、ストレス耐性の上昇が抑制された(Figure 13B)。*drsh-1*の神経特異的ノックアウト個体では、親世代および子世代でストレス耐性の上昇が抑制された(Figure 13C)。よって、神経でのDCR-1およびDRSH-1の機能は、ストレス耐性の獲得とその継承に関与することが示唆された。

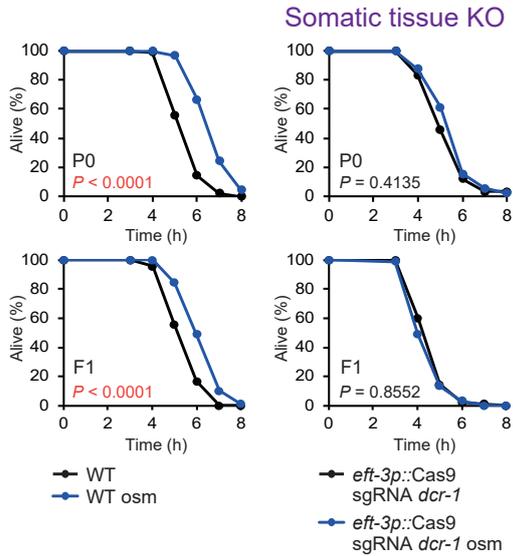
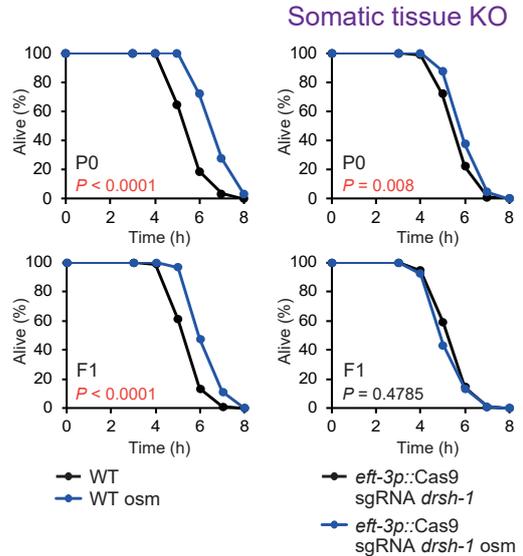
次に、*dcr-1*と*drsh-1*を腸組織でそれぞれノックアウトし、ストレス耐性を測定した。*dcr-1*および*drsh-1*の腸特異的ノックアウト個体では、親世代においてストレス耐性が上昇した(Figure 13B,C)。しかしながら、ストレス耐性の上昇の程度が、野生型に比べ小さいことから、腸におけるsmall RNAの生成は、親世代のストレス耐性の獲得に部分的に関与していると考えられる。子世代の*dcr-1*および*drsh-1*ノックアウト個体は、ストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 13B, C)。以上の結果から、腸でのDCR-1およびDRSH-1の機能は、ストレス耐性の継承に関与することが示唆された。そこで、親世代と子世代、どちらのsmall RNAの生成が、ストレス耐性の継承に関与しているか検討した。線虫では、インジェクションによって導入されたDNAは、extrachromosomal arrayと呼ばれる巨大なDNAを形成する(Mello *et al.*, 1991)。このextrachromosomal arrayは、細胞分裂時にランダムに失われるため(Kadandale *et al.*, 2009)、ノックアウトした線虫からは、extrachromosomal arrayを持つノックアウト個体と、extrachromosomal arrayを持たない野生型(no array)の2種類が産まれてくる(Figure 13D)。そこで、親世代に*dcr-1*および*drsh-1*を腸特異的にノックアウト

した個体、子世代に野生型(no array)の個体を用いて、酸化ストレス耐性を測定した。その結果、*dcr-1* と *drsh-1* をそれぞれ腸特異的にノックアウトした親虫から生まれた子世代の線虫(no array)は、ストレス耐性の上昇がみられなかった(Figure 13E)。したがって、子世代へのストレス耐性の継承には、親世代の腸での DCR-1 および DRSH-1 の機能が必要であることがわかった。

### ストレス耐性の獲得と継承に生殖腺の DCR-1 および DRSH-1 の機能は不要である

最後に、DCR-1 および DRSH-1 の生殖腺での機能が、ストレス耐性の継承に必要であるかを調べた。生殖腺では目的の遺伝子をノックアウトできないことから、生殖腺特異的に *dcr-1* と *drsh-1* をノックダウンし、親世代および子世代のストレス耐性を測定した。面白いことに、生殖腺特異的 *dcr-1* および *drsh-1* ノックダウンは、親世代と子世代の両方でストレス耐性の上昇を抑えなかった(Figure 14A)。このことは、ストレス耐性の獲得と継承において、生殖腺での endo-siRNA および miRNA の生成は関与しないことを示しており、神経と腸の small RNA の生成のみ必要とされる可能性が示唆された。この可能性を検討するため、*dcr-1* 変異体(*tm12491*)に神経特異的に *dcr-1* をレスキューした線虫、神経および腸特異的に *dcr-1* をレスキューした線虫を用意し、ストレス耐性を測定した。その結果、神経特異的に *dcr-1* をレスキューした線虫は、親世代ではストレス耐性の上昇が回復したが、子世代では回復しなかった(Figure 14B)。一方、神経および腸特異的に *dcr-1* をレスキューした線虫は、親世代と子世代の両方で、ストレス耐性の上昇が回復した(Figure 14B)。このことは、神経から腸への small RNA のシグナルが、ストレス耐性の獲得とその継承に関与していることを示唆している。しかしながら、germline nuclear RNAi 経路がストレス耐性の継承に必要であることから、ストレス耐性の継承において、endo-siRNA は生殖腺内で機能していると考えられる。線虫は、DCR-1 に依存しない RNA 依存性 RNA ポリメラーゼによる small RNA の増

幅機構を有することが報告されている(Fischer *et al.*, 2011; Vasale *et al.*, 2010)。したがって、ストレス耐性の継承において、神経と腸で生成された small RNA が生殖腺へと伝わり、生殖腺内で増幅し機能していると推測される。

**A****B**

## Figure 12. ストレス耐性の獲得には体細胞組織の DCR-1 および DRSH-1 の機能が必要である

(A) 野生型(左)と体細胞組織特異的に *dcr-1* をノックアウトした線虫(右)の親世代(上段)および子世代(下段)の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.8 mM) を示す。

(B) 野生型(左)と体細胞組織特異的に *drsh-1* をノックアウトした線虫(右)の親世代(上段)および子世代(下段)の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.8 mM) を示す。

3 回分の実験を統合したグラフを示す。p 値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータは Table 10 に示す。

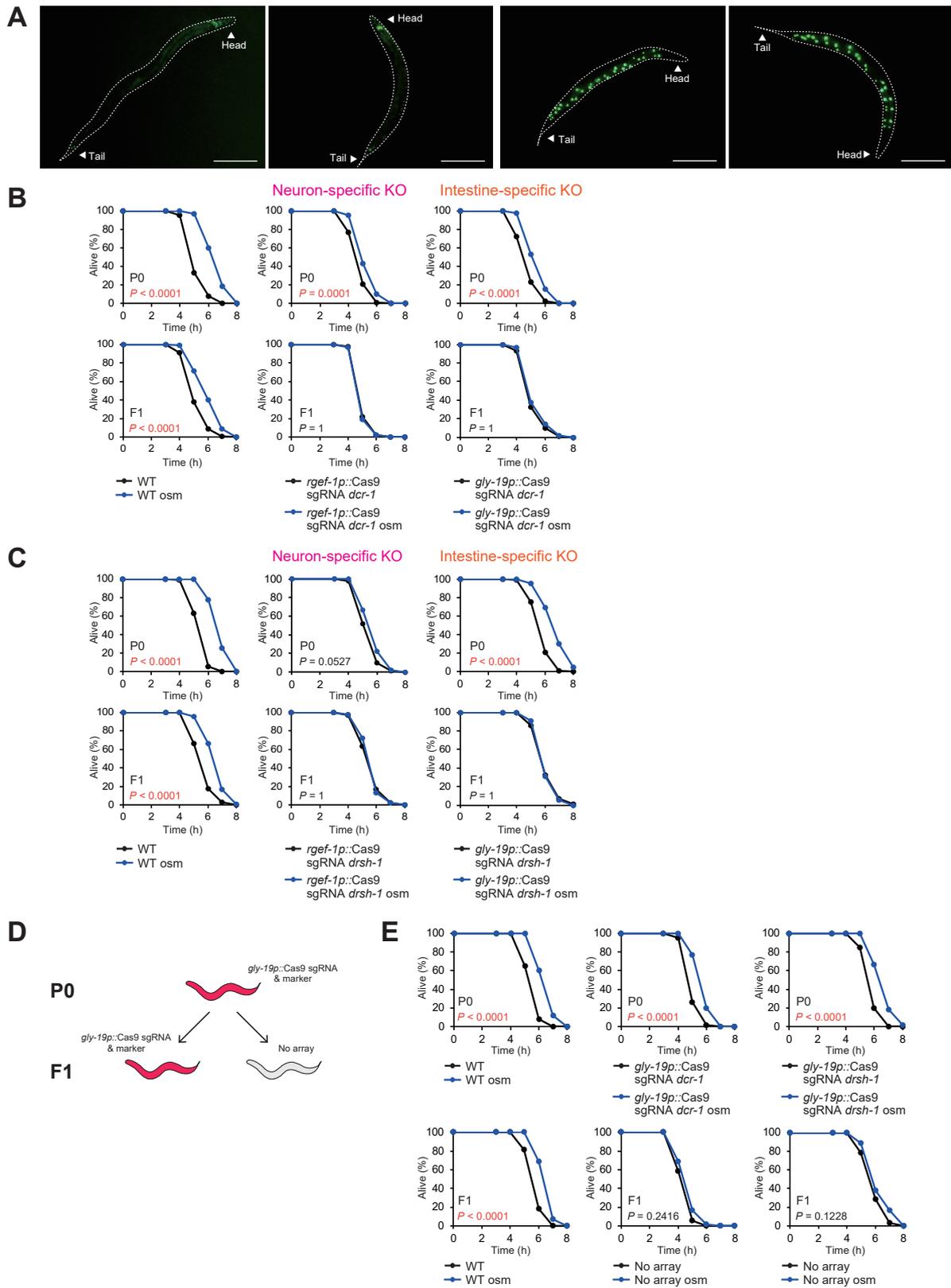


Figure 13. (Figure legend は次頁に示す)

### Figure 13. ストレス耐性の獲得および継承に神経と腸の DCR-1 および DRSH-1 の機能が必要である

(A) NLS::wGFP の発現パターン。左から神経特異的に *dcr-1* をノックアウトした線虫、神経特異的に *drsh-1* をノックアウトした線虫、腸特異的に *dcr-1* をノックアウトした線虫、腸特異的に *drsh-1* をノックアウトした線虫。

(B) 野生型 (左)、神経特異的に *dcr-1* をノックアウトした線虫 (中央)、腸組織特異的に *dcr-1* をノックアウトした線虫 (右) の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.8 mM) を示す。

(C) 野生型 (左)、神経特異的に *drsh-1* をノックアウトした線虫 (中央)、腸組織特異的に *drsh-1* をノックアウトした線虫 (右) の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.8 mM) を示す。

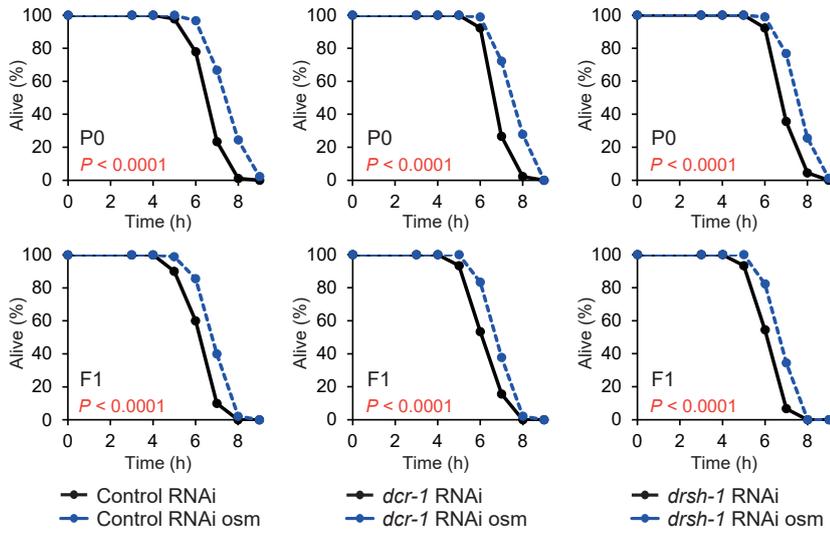
(D) 腸組織で *dcr-1* または *drsh-1* ノックアウトした親世代の線虫から No array の野生型の線虫を得る方法の模式図。

(E) 野生型 (左)、腸特異的に *dcr-1* をノックアウトした線虫 (中央)、腸組織特異的に *drsh-1* をノックアウトした線虫 (右) の親世代 (上段) とその子世代 (No array) (下段) の酸化ストレス耐性 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.8 mM) を示す。

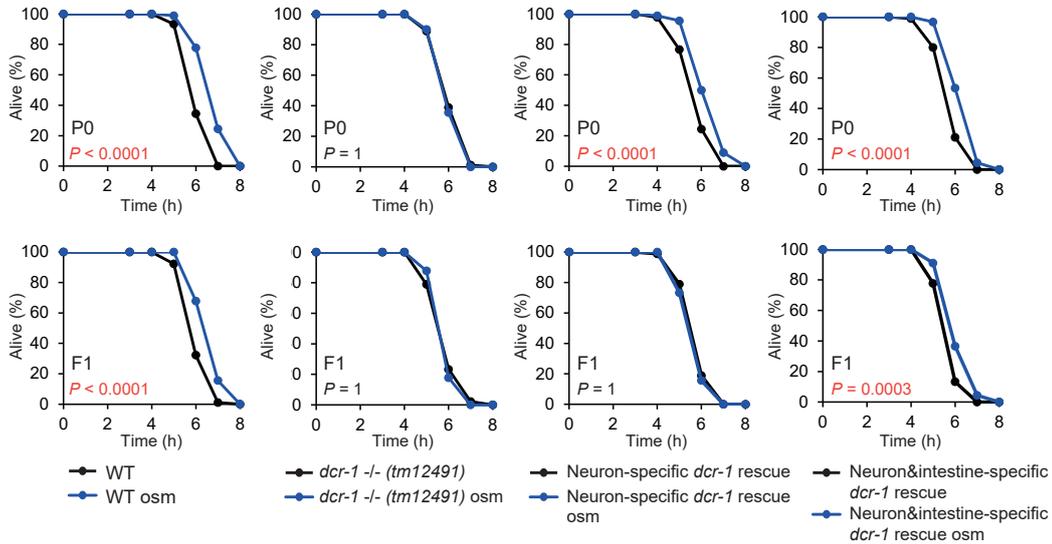
2 または 3 回分の実験を統合したグラフを示す。生存曲線の  $p$  値は log-rank test により Bonferroni の多重比較検定を行い算出した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータは Table 11 に示す。

**A**

Germline-specific RNAi (DCL569)



**B**



**Figure 14. ストレス耐性の獲得と継承に生殖腺の DCR-1 および DRSH-1 の機能は不要である**

(A) 親世代で生殖腺特異的に control RNAi (左)、*dcr-1* RNAi (中央)、*drsh-1* RNAi (右) を行った場合の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $H_2O_2$  2.0 mM) を示す。

(B) 野生型 (左端)、*dcr-1* 変異体 (左)、神経特異的 *dcr-1* レスキュー変異体 (右)、神経および腸特異的 *dcr-1* レスキュー変異体 (右端) の親世代 (上段) および子世代 (下段) の酸化ストレス耐性 ( $H_2O_2$  1.8 mM) を示す。

3 回分の実験を統合したグラフを示す。p 値は log-rank test により Bonferroni の多重比較検定を行い算出した。各実験における平均生存時間などの詳細なデータは Table 12 に示す。

**Table 1. *dcr-1* 変異体の酸化ストレス耐性**

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.				#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
2B	P0	WT	Ctrl	5.63 $\pm$ 0.35	6.20 $\pm$ 0.14	5.00 $\pm$ 0.12	5.70 $\pm$ 0.13	90 (3)
			Osm	6.84 $\pm$ 0.34	7.40 $\pm$ 0.18	6.23 $\pm$ 0.12	6.90 $\pm$ 0.13	90 (3)
		<i>dcr-1 -/-</i>	Ctrl	7.28 $\pm$ 0.20	7.00 $\pm$ 0.22	7.17 $\pm$ 0.29	7.67 $\pm$ 0.20	90 (3)
			Osm	7.42 $\pm$ 0.40	6.70 $\pm$ 0.20	7.47 $\pm$ 0.29	8.10 $\pm$ 0.22	90 (3)
2C	P0	WT	Ctrl	5.98 $\pm$ 0.12	6.20 $\pm$ 0.17	5.77 $\pm$ 0.13	5.97 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	7.29 $\pm$ 0.15	7.50 $\pm$ 0.15	7.00 $\pm$ 0.12	7.37 $\pm$ 0.15	90 (3)
		<i>dcr-1 +/-</i>	Ctrl	6.33 $\pm$ 0.33	6.80 $\pm$ 0.25	6.50 $\pm$ 0.19	5.70 $\pm$ 0.15	90 (3)
			Osm	6.39 $\pm$ 0.40	6.70 $\pm$ 0.20	6.87 $\pm$ 0.21	5.60 $\pm$ 0.11	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	6.17 $\pm$ 0.22	6.47 $\pm$ 0.13	5.73 $\pm$ 0.15	6.30 $\pm$ 0.16	90 (3)
			Osm	7.18 $\pm$ 0.19	7.30 $\pm$ 0.13	6.80 $\pm$ 0.17	7.43 $\pm$ 0.17	90 (3)
		<i>dcr-1 -/-</i>	Ctrl	7.04 $\pm$ 0.42	7.40 $\pm$ 0.23	7.53 $\pm$ 0.23	6.20 $\pm$ 0.24	90 (3)
			Osm	7.44 $\pm$ 0.31	7.77 $\pm$ 0.18	7.73 $\pm$ 0.21	6.83 $\pm$ 0.22	90 (3)
2D	P0	WT	Ctrl	6.07 $\pm$ 0.06	5.97 $\pm$ 0.12	6.07 $\pm$ 0.10	6.17 $\pm$ 0.10	90 (3)
			Osm	6.84 $\pm$ 0.07	6.70 $\pm$ 0.12	6.90 $\pm$ 0.11	6.93 $\pm$ 0.10	90 (3)
		<i>dcr-1 -/-</i>	Ctrl	6.13 $\pm$ 0.03	6.10 $\pm$ 0.15	6.20 $\pm$ 0.11	6.10 $\pm$ 0.10	90 (3)
			Osm	6.20 $\pm$ 0.05	6.27 $\pm$ 0.14	6.10 $\pm$ 0.12	6.23 $\pm$ 0.10	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	6.24 $\pm$ 0.10	6.43 $\pm$ 0.10	6.23 $\pm$ 0.11	6.07 $\pm$ 0.08	90 (3)
			Osm	6.94 $\pm$ 0.11	7.10 $\pm$ 0.11	7.00 $\pm$ 0.12	6.73 $\pm$ 0.10	90 (3)
		<i>dcr-1 -/-</i>	Ctrl	6.18 $\pm$ 0.07	6.23 $\pm$ 0.11	6.27 $\pm$ 0.15	6.03 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	6.16 $\pm$ 0.12	6.40 $\pm$ 0.13	6.03 $\pm$ 0.11	6.03 $\pm$ 0.09	90 (3)

Figure	Generation		Condition	<i>p</i> -value				
				vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	
2B	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	0.0062	0.0007
		3	<i>dcr-1 -/-</i>	Ctrl	< 0.0001	0.0062	-	1
				Osm	< 0.0001	0.0007	1	-
2C	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	0.0516	0.0172
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001
		3	<i>dcr-1 +/-</i>	Ctrl	0.0516	< 0.0001	-	1
				Osm	0.0172	< 0.0001	1	-

次頁に続く

Figure	Generation		Condition	p-value				
				vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	
2C	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	1	0.0923
		4	<i>dcr-1 -/-</i>	Ctrl	< 0.0001	1	-	0.3147
				Osm	< 0.0001	0.0923	0.3147	-
2D	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	1	0.4538
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001
		4	<i>dcr-1 -/-</i>	Ctrl	1	< 0.0001	-	1
				Osm	0.4538	< 0.0001	1	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	1	1
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001
		4	<i>dcr-1 -/-</i>	Ctrl	1	< 0.0001	-	1
				Osm	1	< 0.0001	1	-

p値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

**Table 2. MAGO12 変異体の酸化ストレス耐性**

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.				#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
3	P0	WT	Ctrl	5.57 $\pm$ 0.18	5.90 $\pm$ 0.14	5.53 $\pm$ 0.14	5.27 $\pm$ 0.10	90 (3)
			Osm	6.87 $\pm$ 0.21	7.23 $\pm$ 0.14	6.87 $\pm$ 0.15	6.50 $\pm$ 0.10	90 (3)
		MAGO12	Ctrl	6.99 $\pm$ 0.16	6.67 $\pm$ 0.17	7.20 $\pm$ 0.12	7.10 $\pm$ 0.14	90 (3)
			Osm	7.48 $\pm$ 0.14	7.20 $\pm$ 0.13	7.63 $\pm$ 0.12	7.60 $\pm$ 0.12	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.2 $\pm$ 0.31	4.77 $\pm$ 0.09	5.80 $\pm$ 0.13	5.03 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	5.91 $\pm$ 0.30	5.60 $\pm$ 0.11	6.50 $\pm$ 0.17	5.63 $\pm$ 0.13	90 (3)
		MAGO12	Ctrl	6.93 $\pm$ 0.38	6.33 $\pm$ 0.18	7.63 $\pm$ 0.10	6.83 $\pm$ 0.14	90 (3)
			Osm	7.1 $\pm$ 0.30	6.73 $\pm$ 0.16	7.70 $\pm$ 0.08	6.87 $\pm$ 0.11	90 (3)

Figure	Generation		Condition	<i>p</i> -value				
				vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	
3	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	0.1345	< 0.0001
		3	MAGO12	Ctrl	< 0.0001	0.1345	-	0.0003
				Osm	< 0.0001	< 0.0001	0.0003	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001
		3	MAGO12	Ctrl	< 0.0001	< 0.0001	-	1
				Osm	< 0.0001	< 0.0001	1	-

*p*値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

**Table 3. *drsh-1* 変異体の酸化ストレス耐性**

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.				#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
4A	P0	WT	Ctrl	5.83 $\pm$ 0.30	6.37 $\pm$ 0.16	5.33 $\pm$ 0.17	5.80 $\pm$ 0.17	90 (3)
			Osm	7.27 $\pm$ 0.2	7.63 $\pm$ 0.14	6.93 $\pm$ 0.16	7.23 $\pm$ 0.17	90 (3)
		<i>drsh-1 -/-</i>	Ctrl	7.89 $\pm$ 0.14	8.17 $\pm$ 0.24	7.80 $\pm$ 0.26	7.70 $\pm$ 0.23	90 (3)
			Osm	7.94 $\pm$ 0.24	8.43 $\pm$ 0.17	7.73 $\pm$ 0.22	7.67 $\pm$ 0.23	90 (3)
4B	P0	WT	Ctrl	5.86 $\pm$ 0.19	6.20 $\pm$ 0.14	5.53 $\pm$ 0.15	5.83 $\pm$ 0.16	90 (3)
			Osm	7.43 $\pm$ 0.17	7.77 $\pm$ 0.17	7.27 $\pm$ 0.17	7.27 $\pm$ 0.19	90 (3)
		<i>drsh-1 +/-</i>	Ctrl	6.8 $\pm$ 0.17	7.10 $\pm$ 0.17	6.77 $\pm$ 0.20	6.53 $\pm$ 0.24	90 (3)
			Osm	6.91 $\pm$ 0.08	7.07 $\pm$ 0.24	6.80 $\pm$ 0.23	6.87 $\pm$ 0.20	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.58 $\pm$ 0.41	6.33 $\pm$ 0.14	4.93 $\pm$ 0.10	5.47 $\pm$ 0.13	90 (3)
			Osm	6.54 $\pm$ 0.45	7.37 $\pm$ 0.12	5.80 $\pm$ 0.11	6.47 $\pm$ 0.15	90 (3)
		<i>drsh-1 -/-</i>	Ctrl	7.96 $\pm$ 0.23	8.27 $\pm$ 0.16	8.10 $\pm$ 0.19	7.50 $\pm$ 0.22	90 (3)
			Osm	7.86 $\pm$ 0.27	7.83 $\pm$ 0.21	8.33 $\pm$ 0.23	7.40 $\pm$ 0.23	90 (3)

Figure	Generation		Condition	<i>p</i> -value				
				vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	
4A	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	0.0001	< 0.0001
		3	<i>drsh-1 -/-</i>	Ctrl	< 0.0001	0.0001	-	1
				Osm	< 0.0001	< 0.0001	1	-
4B	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	0.0057	0.0656
		3	<i>drsh-1 +/-</i>	Ctrl	< 0.0001	0.0057	-	1
				Osm	< 0.0001	0.0656	1	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001
		3	<i>drsh-1 -/-</i>	Ctrl	< 0.0001	< 0.0001	-	1
				Osm	< 0.0001	< 0.0001	1	-

*p*値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

**Table 4. L4 から *dcr-1* および *drsh-1* をノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性**

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.				#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
5	P0	Ctrl RNAi	Ctrl	6.13 $\pm$ 0.10	5.93 $\pm$ 0.12	6.23 $\pm$ 0.14	6.23 $\pm$ 0.10	90 (3)
			Osm	6.98 $\pm$ 0.13	6.77 $\pm$ 0.13	7.23 $\pm$ 0.12	6.93 $\pm$ 0.10	90 (3)
		<i>dcr-1</i> RNAi	Ctrl	6.33 $\pm$ 0.06	6.23 $\pm$ 0.13	6.43 $\pm$ 0.13	6.33 $\pm$ 0.10	90 (3)
			Osm	6.28 $\pm$ 0.06	6.23 $\pm$ 0.14	6.20 $\pm$ 0.11	6.40 $\pm$ 0.10	90 (3)
		<i>drsh-1</i> RNAi	Ctrl	6.26 $\pm$ 0.10	6.07 $\pm$ 0.12	6.30 $\pm$ 0.12	6.40 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	6.46 $\pm$ 0.08	6.30 $\pm$ 0.13	6.53 $\pm$ 0.11	6.53 $\pm$ 0.10	90 (3)
	F1	Ctrl RNAi	Ctrl	6.17 $\pm$ 0.12	6.17 $\pm$ 0.13	5.97 $\pm$ 0.14	6.37 $\pm$ 0.11	90 (3)
			Osm	6.86 $\pm$ 0.06	6.83 $\pm$ 0.13	6.77 $\pm$ 0.14	6.97 $\pm$ 0.12	90 (3)
		<i>dcr-1</i> RNAi	Ctrl	6.98 $\pm$ 0.05	6.93 $\pm$ 0.11	7.07 $\pm$ 0.11	6.93 $\pm$ 0.11	90 (3)
			Osm	7.04 $\pm$ 0.07	7.10 $\pm$ 0.13	7.13 $\pm$ 0.12	6.90 $\pm$ 0.14	90 (3)
		<i>drsh-1</i> RNAi	Ctrl	6.94 $\pm$ 0.04	6.90 $\pm$ 0.14	7.03 $\pm$ 0.12	6.90 $\pm$ 0.10	90 (3)
			Osm	6.88 $\pm$ 0.04	6.93 $\pm$ 0.11	6.87 $\pm$ 0.11	6.80 $\pm$ 0.12	90 (3)

Figure	Generation		Condition	<i>p</i> -value						
				vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	vs 5	vs 6	
5	P0	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	< 0.0001	0.3459	0.9438	1	0.0117
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
		3	<i>dcr-1</i> RNAi	Ctrl	0.3459	< 0.0001	-	1	1	1
				Osm	0.9438	< 0.0001	1	-	1	0.3506
		5	<i>drsh-1</i> RNAi	Ctrl	1	< 0.0001	1	1	-	0.2693
				Osm	0.0117	< 0.0001	1	0.3506	0.2693	-
	F1	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	1	0.2039	1	1
		3	<i>dcr-1</i> RNAi	Ctrl	< 0.0001	1	-	1	1	1
				Osm	< 0.0001	0.2039	1	-	1	0.2835
		5	<i>drsh-1</i> RNAi	Ctrl	< 0.0001	1	1	1	-	1
				Osm	< 0.0001	1	1	0.2835	1	-

*p*値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

**Table 5.** 子世代で *dcr-1* および *drsh-1* をノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.			#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	
6	F1	Ctrl RNAi	Ctrl	5.73 $\pm$ 0.10	5.63 $\pm$ 0.10	5.83 $\pm$ 0.13	60 (2)
			Osm	6.50 $\pm$ 0.17	6.33 $\pm$ 0.11	6.67 $\pm$ 0.14	60 (2)
		<i>dcr-1</i> RNAi	Ctrl	6.15 $\pm$ 0.22	6.37 $\pm$ 0.12	5.93 $\pm$ 0.15	60 (2)
			Osm	6.22 $\pm$ 0.02	6.23 $\pm$ 0.13	6.20 $\pm$ 0.15	60 (2)
		<i>drsh-1</i> RNAi	Ctrl	6.13 $\pm$ 0.07	6.07 $\pm$ 0.09	6.20 $\pm$ 0.12	60 (2)
			Osm	6.08 $\pm$ 0.09	6.17 $\pm$ 0.10	6.00 $\pm$ 0.12	60 (2)

Figure	Generation			Condition	p-value					
					vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	vs 5	vs 6
6	F1	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	< 0.0001	0.0091	0.0012	0.0059	0.0211
				Osm	< 0.0001	-	0.0762	0.2867	0.0081	0.002
		3	<i>dcr-1</i> RNAi	Ctrl	0.0091	0.0762	-	1	1	1
				Osm	0.0012	0.2867	1	-	1	0.7634
		5	<i>drsh-1</i> RNAi	Ctrl	0.0059	0.0081	1	1	-	1
				Osm	0.0211	0.002	1	0.7634	1	-

$p$ 値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、Nは実験回を示す。

**Table 6.** *hrde-1* 変異体および *nrde-1,2,4* 変異体の酸化ストレス耐性

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean ± S.E.				#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
8A	P0	WT	Ctrl	5.10 ± 0.20	4.70 ± 0.12	5.23 ± 0.10	5.37 ± 0.09	90 (3)
			Osm	6.21 ± 0.12	6.00 ± 0.15	6.20 ± 0.15	6.43 ± 0.13	90 (3)
		<i>hrde-1</i>	Ctrl	5.79 ± 0.21	5.37 ± 0.16	5.93 ± 0.16	6.07 ± 0.15	90 (3)
			Osm	6.64 ± 0.22	6.20 ± 0.18	6.80 ± 0.17	6.93 ± 0.13	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	4.99 ± 0.13	4.80 ± 0.11	4.93 ± 0.11	5.23 ± 0.11	90 (3)
			Osm	5.74 ± 0.14	5.60 ± 0.13	5.60 ± 0.13	6.03 ± 0.13	90 (3)
		<i>hrde-1</i>	Ctrl	5.62 ± 0.15	5.57 ± 0.14	5.40 ± 0.13	5.90 ± 0.14	90 (3)
			Osm	5.68 ± 0.22	5.77 ± 0.16	5.27 ± 0.13	6.00 ± 0.14	90 (3)
8B	P0	Ctrl RNAi	Ctrl	6.38 ± 0.07	6.37 ± 0.15	6.50 ± 0.12	6.27 ± 0.13	90 (3)
			Osm	7.33 ± 0.14	7.10 ± 0.15	7.57 ± 0.10	7.33 ± 0.12	90 (3)
		<i>hrde-1</i> RNAi	Ctrl	6.37 ± 0.07	6.33 ± 0.15	6.50 ± 0.12	6.27 ± 0.09	90 (3)
			Osm	7.19 ± 0.22	6.87 ± 0.13	7.60 ± 0.10	7.10 ± 0.13	90 (3)
	F1	Ctrl RNAi	Ctrl	6.38 ± 0.09	6.47 ± 0.14	6.47 ± 0.12	6.20 ± 0.12	90 (3)
			Osm	7.09 ± 0.08	7.17 ± 0.13	7.17 ± 0.12	6.93 ± 0.11	90 (3)
		<i>hrde-1</i> RNAi	Ctrl	7.00 ± 0.05	7.10 ± 0.13	6.97 ± 0.11	6.93 ± 0.09	90 (3)
			Osm	6.96 ± 0.03	6.90 ± 0.11	7.00 ± 0.09	6.97 ± 0.09	90 (3)

Figure	Generation		Condition	<i>p</i> -value				
				vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	
8A	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	0.0086	0.0018
		4	<i>hrde-1</i>	Ctrl	< 0.0001	0.0086	-	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	0.0018	< 0.0001	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	1	1
		4	<i>hrde-1</i>	Ctrl	< 0.0001	1	-	1
				Osm	< 0.0001	1	1	-
8B	P0	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	< 0.0001	1	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	0.7429
		4	<i>hrde-1</i> RNAi	Ctrl	1	< 0.0001	-	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	0.7429	< 0.0001	-

次頁に続く

Figure	Generation		Condition	p-value				
				vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	
8B	F1	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	1	0.237
		3	<i>hrde-1</i> RNAi	Ctrl	< 0.0001	1	-	1
				Osm	< 0.0001	0.237	1	-

p値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean ± S.D.	#animals (N)
8D	P0	WT	Ctrl	5.11 ± 0.13	90 (3)
			Osm	6.43 ± 0.42	90 (3)
		<i>nrde-1</i>	Ctrl	5.73 ± 0.29	90 (3)
			Osm	6.87 ± 0.32	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.07 ± 0.04	90 (3)
			Osm	5.74 ± 0.07	90 (3)
		<i>nrde-1</i>	Ctrl	5.94 ± 0.34	90 (3)
			Osm	6.29 ± 0.40	90 (3)
	P0	WT	Ctrl	5.46 ± 0.22	90 (3)
			Osm	6.56 ± 0.32	90 (3)
		<i>nrde-2</i>	Ctrl	6.18 ± 0.25	90 (3)
			Osm	6.96 ± 0.40	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.10 ± 0.09	90 (3)
			Osm	5.77 ± 0.12	90 (3)
		<i>nrde-2</i>	Ctrl	5.84 ± 0.40	90 (3)
			Osm	5.90 ± 0.47	90 (3)
	P0	WT	Ctrl	5.37 ± 0.32	90 (3)
			Osm	6.33 ± 0.42	90 (3)
		<i>nrde-4</i>	Ctrl	6.12 ± 0.57	90 (3)
			Osm	6.89 ± 0.65	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.00 ± 0.03	90 (3)
			Osm	5.69 ± 0.05	90 (3)
		<i>nrde-4</i>	Ctrl	6.01 ± 0.13	90 (3)
			Osm	5.97 ± 0.12	90 (3)

#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

**Table 7. *set-25* 変異体、*set-32* 変異体、*set-25;set-32* 変異体の酸化ストレス耐性**

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.				#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
9A	P0	WT	Ctrl	5.43 $\pm$ 0.19	5.20 $\pm$ 0.10	5.30 $\pm$ 0.14	5.80 $\pm$ 0.14	90 (3)
			Osm	6.70 $\pm$ 0.19	6.33 $\pm$ 0.11	6.87 $\pm$ 0.11	6.90 $\pm$ 0.10	90 (3)
		<i>set-25</i>	Ctrl	5.60 $\pm$ 0.17	5.43 $\pm$ 0.12	5.50 $\pm$ 0.12	5.87 $\pm$ 0.18	90 (3)
			Osm	6.63 $\pm$ 0.22	6.20 $\pm$ 0.14	6.93 $\pm$ 0.10	6.77 $\pm$ 0.15	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.66 $\pm$ 0.33	5.00 $\pm$ 0.13	5.90 $\pm$ 0.14	6.07 $\pm$ 0.11	90 (3)
			Osm	6.39 $\pm$ 0.38	5.63 $\pm$ 0.16	6.70 $\pm$ 0.16	6.83 $\pm$ 0.14	90 (3)
		<i>set-25</i>	Ctrl	5.47 $\pm$ 0.26	5.03 $\pm$ 0.07	5.43 $\pm$ 0.14	5.93 $\pm$ 0.13	90 (3)
			Osm	5.57 $\pm$ 0.30	4.97 $\pm$ 0.10	5.80 $\pm$ 0.11	5.93 $\pm$ 0.10	90 (3)
9B	P0	WT	Ctrl	5.63 $\pm$ 0.15	5.63 $\pm$ 0.12	5.90 $\pm$ 0.12	5.37 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	7.19 $\pm$ 0.11	6.97 $\pm$ 0.13	7.23 $\pm$ 0.14	7.37 $\pm$ 0.15	90 (3)
		<i>set-32</i>	Ctrl	5.87 $\pm$ 0.31	6.00 $\pm$ 0.13	6.33 $\pm$ 0.15	5.27 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	7.26 $\pm$ 0.06	7.17 $\pm$ 0.12	7.37 $\pm$ 0.12	7.23 $\pm$ 0.12	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.66 $\pm$ 0.36	4.93 $\pm$ 0.10	6.07 $\pm$ 0.17	5.97 $\pm$ 0.13	90 (3)
			Osm	6.29 $\pm$ 0.39	5.50 $\pm$ 0.14	6.63 $\pm$ 0.17	6.73 $\pm$ 0.13	90 (3)
		<i>set-32</i>	Ctrl	5.70 $\pm$ 0.38	5.03 $\pm$ 0.12	6.33 $\pm$ 0.18	5.73 $\pm$ 0.11	90 (3)
			Osm	5.84 $\pm$ 0.42	5.07 $\pm$ 0.07	6.53 $\pm$ 0.17	5.93 $\pm$ 0.15	90 (3)
9C	P0	WT	Ctrl	5.36 $\pm$ 0.09	5.17 $\pm$ 0.11	5.47 $\pm$ 0.12	5.43 $\pm$ 0.14	90 (3)
			Osm	6.52 $\pm$ 0.24	6.23 $\pm$ 0.13	7.00 $\pm$ 0.12	6.33 $\pm$ 0.13	90 (3)
		<i>set-25;set-32</i>	Ctrl	6.46 $\pm$ 0.12	6.37 $\pm$ 0.14	6.70 $\pm$ 0.12	6.30 $\pm$ 0.14	90 (3)
			Osm	7.17 $\pm$ 0.17	7.03 $\pm$ 0.15	7.50 $\pm$ 0.11	6.97 $\pm$ 0.15	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.47 $\pm$ 0.33	4.93 $\pm$ 0.10	5.40 $\pm$ 0.11	6.07 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	6.22 $\pm$ 0.34	5.63 $\pm$ 0.15	6.23 $\pm$ 0.12	6.80 $\pm$ 0.13	90 (3)
		<i>set-25;set-32</i>	Ctrl	6.69 $\pm$ 0.21	6.30 $\pm$ 0.13	6.73 $\pm$ 0.11	7.03 $\pm$ 0.15	90 (3)
			Osm	6.82 $\pm$ 0.18	6.50 $\pm$ 0.13	7.13 $\pm$ 0.11	6.83 $\pm$ 0.17	90 (3)

次頁に続く

Figure	Generation			Condition	p-value			
					vs 1	vs 2	vs 3	vs 4
9A	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	0.4396	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	1
		3	set-25	Ctrl	0.4396	< 0.0001	-	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	1	< 0.0001	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	0.2473	0.8548
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001
		3	set-25	Ctrl	0.2473	< 0.0001	-	1
				Osm	0.8548	< 0.0001	1	-
9B	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	0.077	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	1
		3	set-32	Ctrl	0.077	< 0.0001	-	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	1	< 0.0001	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	0.0001	1	0.5402
				Osm	0.0001	-	0.0004	0.0163
		3	set-32	Ctrl	1	0.0004	-	0.9798
				Osm	0.5402	0.0163	0.9798	-
9C	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	1	< 0.0001
		3	set-25;set-32	Ctrl	< 0.0001	1	-	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	0.0013	< 0.0001
		3	set-25;set-32	Ctrl	< 0.0001	0.0013	-	0.9595
				Osm	< 0.0001	< 0.0001	0.9595	-

p値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

**Table 8.** *sid-1* 変異体および組織特異的に *sid-1* をノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.				#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
10A	P0	WT	Ctrl	5.20 $\pm$ 0.11	5.37 $\pm$ 0.15	5.00 $\pm$ 0.08	5.23 $\pm$ 0.09	90 (3)
			Osm	6.27 $\pm$ 0.56	6.40 $\pm$ 0.13	6.30 $\pm$ 0.18	6.10 $\pm$ 0.10	90 (3)
		<i>sid-1</i>	Ctrl	5.47 $\pm$ 0.19	5.37 $\pm$ 0.14	5.20 $\pm$ 0.09	5.83 $\pm$ 0.17	90 (3)
			Osm	5.68 $\pm$ 0.12	5.67 $\pm$ 0.15	5.47 $\pm$ 0.15	5.90 $\pm$ 0.18	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	4.97 $\pm$ 0.07	5.07 $\pm$ 0.10	5.00 $\pm$ 0.11	4.83 $\pm$ 0.10	90 (3)
			Osm	5.66 $\pm$ 0.13	5.77 $\pm$ 0.13	5.80 $\pm$ 0.16	5.40 $\pm$ 0.13	90 (3)
		<i>sid-1</i>	Ctrl	5.29 $\pm$ 0.04	5.23 $\pm$ 0.11	5.27 $\pm$ 0.09	5.37 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	5.32 $\pm$ 0.09	5.23 $\pm$ 0.10	5.23 $\pm$ 0.11	5.50 $\pm$ 0.17	90 (3)
10B	P0	Ctrl RNAi	Ctrl	7.02 $\pm$ 0.13	7.10 $\pm$ 0.16	6.77 $\pm$ 0.19	7.20 $\pm$ 0.15	90 (3)
			Osm	7.53 $\pm$ 0.03	7.50 $\pm$ 0.13	7.47 $\pm$ 0.13	7.57 $\pm$ 0.11	90 (3)
		<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	7.33 $\pm$ 0.30	7.77 $\pm$ 0.09	6.77 $\pm$ 0.16	7.47 $\pm$ 0.13	90 (3)
			Osm	7.19 $\pm$ 0.24	7.43 $\pm$ 0.14	6.70 $\pm$ 0.16	7.43 $\pm$ 0.11	90 (3)
	F1	Ctrl RNAi	Ctrl	6.58 $\pm$ 0.11	6.67 $\pm$ 0.18	6.37 $\pm$ 0.19	6.70 $\pm$ 0.17	90 (3)
			Osm	7.08 $\pm$ 0.05	7.13 $\pm$ 0.15	6.97 $\pm$ 0.15	7.13 $\pm$ 0.15	90 (3)
		<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	6.99 $\pm$ 0.19	6.80 $\pm$ 0.18	6.80 $\pm$ 0.16	7.37 $\pm$ 0.14	90 (3)
			Osm	6.86 $\pm$ 0.12	6.83 $\pm$ 0.16	6.60 $\pm$ 0.15	7.00 $\pm$ 0.16	90 (3)
10C	P0	Ctrl RNAi	Ctrl	6.72 $\pm$ 0.12	6.83 $\pm$ 0.16	6.60 $\pm$ 0.15	-	60 (2)
			Osm	7.78 $\pm$ 0.15	7.93 $\pm$ 0.14	7.63 $\pm$ 0.17	-	60 (2)
		<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	6.92 $\pm$ 0.02	6.90 $\pm$ 0.12	6.93 $\pm$ 0.16	-	60 (2)
			Osm	7.90 $\pm$ 0.13	7.77 $\pm$ 0.12	8.03 $\pm$ 0.15	-	60 (2)
	F1	Ctrl RNAi	Ctrl	6.45 $\pm$ 0.12	6.57 $\pm$ 0.15	6.33 $\pm$ 0.13	-	60 (2)
			Osm	7.28 $\pm$ 0.12	7.40 $\pm$ 0.15	7.17 $\pm$ 0.14	-	60 (2)
		<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	6.70 $\pm$ 0.03	6.73 $\pm$ 0.14	6.67 $\pm$ 0.14	-	60 (2)
			Osm	6.78 $\pm$ 0.02	6.77 $\pm$ 0.14	6.80 $\pm$ 0.16	-	60 (2)

次頁に続く

Figure	Generation			Condition	p-value			
					vs 1	vs 2	vs 3	vs 4
10A	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	0.0401	0.0002
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	0.0001
		3	<i>sid-1</i>	Ctrl	0.0401	< 0.0001	-	0.2663
				Osm	0.0002	0.0001	0.2663	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	0.0013	0.0015
				Osm	< 0.0001	-	0.001	0.012
		3	<i>sid-1</i>	Ctrl	0.0013	0.001	-	1
				Osm	0.0015	0.012	1	-
10B	P0	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	0.0024	0.0632	1
				Osm	0.0024	-	1	0.0243
		3	<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	0.0632	1	-	0.3408
				Osm	1	0.0243	0.3408	-
	F1	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	0.0028	0.0255	0.3067
				Osm	0.0028	-	1	0.2376
		3	<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	0.0255	1	-	0.8708
				Osm	0.3067	0.2376	0.8708	-
10C	P0	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	< 0.0001	0.885	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	1
		3	<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	0.885	< 0.0001	-	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	1	< 0.0001	-
	F1	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	< 0.0001	0.2802	0.0669
				Osm	< 0.0001	-	0.0005	0.007
		3	<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	0.2802	0.0005	-	1
				Osm	0.0669	0.007	1	-

p値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

**Table 9.** 子世代で *sid-1* を全身または組織特異的にノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.				#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
11A	F1	Ctrl RNAi	Ctrl	5.96 $\pm$ 0.46	6.40 $\pm$ 0.11	5.03 $\pm$ 0.12	6.43 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	6.59 $\pm$ 0.40	7.00 $\pm$ 0.14	5.80 $\pm$ 0.17	6.97 $\pm$ 0.14	90 (3)
		<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	6.17 $\pm$ 0.37	6.43 $\pm$ 0.14	5.43 $\pm$ 0.16	6.63 $\pm$ 0.14	90 (3)
			Osm	6.28 $\pm$ 0.33	6.23 $\pm$ 0.15	5.73 $\pm$ 0.17	6.87 $\pm$ 0.15	90 (3)
11B	F1	Ctrl RNAi	Ctrl	6.06 $\pm$ 0.06	6.10 $\pm$ 0.22	5.93 $\pm$ 0.19	6.13 $\pm$ 0.15	90 (3)
			Osm	6.71 $\pm$ 0.02	6.67 $\pm$ 0.20	6.73 $\pm$ 0.18	6.27 $\pm$ 0.16	90 (3)
		<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	6.49 $\pm$ 0.21	6.07 $\pm$ 0.19	6.77 $\pm$ 0.19	6.63 $\pm$ 0.17	90 (3)
			Osm	6.34 $\pm$ 0.24	5.87 $\pm$ 0.18	6.67 $\pm$ 0.17	6.50 $\pm$ 0.19	90 (3)
11C	F1	Ctrl RNAi	Ctrl	6.37 $\pm$ 0.07	6.30 $\pm$ 0.12	6.43 $\pm$ 0.12	-	60 (2)
			Osm	7.07 $\pm$ 0.14	6.93 $\pm$ 0.15	7.20 $\pm$ 0.14	-	60 (2)
		<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	6.35 $\pm$ 0.12	6.23 $\pm$ 0.12	6.47 $\pm$ 0.12	-	60 (2)
			Osm	6.30 $\pm$ 0.10	6.20 $\pm$ 0.09	6.40 $\pm$ 0.11	-	60 (2)

Figure	Generation			Condition	p-value			
					vs 1	vs 2	vs 3	vs 4
11A	F1	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	< 0.0001	0.3656	0.068
				Osm	< 0.0001	-	0.0074	0.0692
		4	<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	0.3656	0.0074	-	1
				Osm	0.068	0.0692	1	-
11B	F1	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	0.0003	0.0188	0.2124
				Osm	0.0003	-	0.8815	0.1498
		4	<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	0.0188	0.8815	-	1
				Osm	0.2124	0.1498	1	-
11C	F1	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	< 0.0001	1	1
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001
		4	<i>sid-1</i> RNAi	Ctrl	1	< 0.0001	-	1
				Osm	1	< 0.0001	1	-

p値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

**Table 10.** *dcr-1* および *drsh-1* をノックアウトした線虫の酸化ストレス耐性

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.				#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
12A	P0	WT	Ctrl	5.71 $\pm$ 0.07	5.77 $\pm$ 0.12	5.60 $\pm$ 0.13	5.77 $\pm$ 0.17	90 (3)
			Osm	6.88 $\pm$ 0.11	6.77 $\pm$ 0.13	6.77 $\pm$ 0.14	7.10 $\pm$ 0.17	90 (3)
		<i>dcr-1</i> KO	Ctrl	5.44 $\pm$ 0.32	4.83 $\pm$ 0.15	5.93 $\pm$ 0.14	5.57 $\pm$ 0.18	90 (3)
			Osm	5.70 $\pm$ 0.32	5.10 $\pm$ 0.16	6.20 $\pm$ 0.10	5.80 $\pm$ 0.21	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.68 $\pm$ 0.30	5.73 $\pm$ 0.13	5.13 $\pm$ 0.11	6.17 $\pm$ 0.13	90 (3)
			Osm	6.43 $\pm$ 0.33	6.37 $\pm$ 0.14	5.90 $\pm$ 0.14	7.03 $\pm$ 0.12	90 (3)
		<i>dcr-1</i> KO	Ctrl	4.78 $\pm$ 0.11	4.83 $\pm$ 0.13	4.57 $\pm$ 0.10	4.93 $\pm$ 0.18	90 (3)
			Osm	4.64 $\pm$ 0.26	4.97 $\pm$ 0.15	4.13 $\pm$ 0.08	4.83 $\pm$ 0.16	90 (3)
12B	P0	WT	Ctrl	5.87 $\pm$ 0.02	5.90 $\pm$ 0.16	5.87 $\pm$ 0.14	5.83 $\pm$ 0.13	90 (3)
			Osm	7.00 $\pm$ 0.13	6.77 $\pm$ 0.13	7.03 $\pm$ 0.13	7.20 $\pm$ 0.14	90 (3)
		<i>drsh-1</i> KO	Ctrl	5.94 $\pm$ 0.13	6.20 $\pm$ 0.14	5.83 $\pm$ 0.14	5.80 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	6.30 $\pm$ 0.19	6.63 $\pm$ 0.10	5.97 $\pm$ 0.10	6.30 $\pm$ 0.16	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.74 $\pm$ 0.23	5.33 $\pm$ 0.10	5.77 $\pm$ 0.13	6.13 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	6.56 $\pm$ 0.22	6.20 $\pm$ 0.09	6.50 $\pm$ 0.13	6.97 $\pm$ 0.14	90 (3)
		<i>drsh-1</i> KO	Ctrl	5.69 $\pm$ 0.14	5.53 $\pm$ 0.12	5.57 $\pm$ 0.17	5.97 $\pm$ 0.14	90 (3)
			Osm	5.50 $\pm$ 0.22	5.07 $\pm$ 0.12	5.70 $\pm$ 0.17	5.73 $\pm$ 0.13	90 (3)

Figure	Generation		Condition	<i>p</i> -value				
				vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	
12A	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	0.6368	1
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001
		3	<i>dcr-1</i> KO	Ctrl	0.6368	< 0.0001	-	0.4135
				Osm	1	< 0.0001	0.4135	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001
		3	<i>dcr-1</i> KO	Ctrl	< 0.0001	< 0.0001	-	0.8552
				Osm	< 0.0001	< 0.0001	0.8552	-

次頁に続く

Figure	Generation			Condition	p-value			
					vs 1	vs 2	vs 3	vs 4
12B	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	1	0.0017
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001
		3	<i>drsh-1</i> KO	Ctrl	1	< 0.0001	-	0.008
				Osm	0.0017	< 0.0001	0.008	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	1	0.2405
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001
		3	<i>drsh-1</i> KO	Ctrl	1	< 0.0001	-	0.4785
				Osm	0.2405	< 0.0001	0.4785	-

p値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

**Table 11.** *dcr-1* および *drsh-1* を組織特異的にノックアウトした線虫の酸化ストレス耐性

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.				#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
13B	P0	WT	Ctrl	5.37 $\pm$ 0.03	5.33 $\pm$ 0.14	5.33 $\pm$ 0.11	5.43 $\pm$ 0.13	90 (3)
			Osm	6.76 $\pm$ 0.17	6.73 $\pm$ 0.16	7.07 $\pm$ 0.13	6.47 $\pm$ 0.12	90 (3)
		Neuron <i>dcr-1</i> KO	Ctrl	4.99 $\pm$ 0.04	5.07 $\pm$ 0.15	4.97 $\pm$ 0.12	4.93 $\pm$ 0.10	90 (3)
			Osm	5.49 $\pm$ 0.12	5.73 $\pm$ 0.16	5.37 $\pm$ 0.11	5.37 $\pm$ 0.12	90 (3)
		Intestine <i>dcr-1</i> KO	Ctrl	4.98 $\pm$ 0.11	4.90 $\pm$ 0.15	4.83 $\pm$ 0.13	5.20 $\pm$ 0.13	90 (3)
			Osm	5.67 $\pm$ 0.03	5.63 $\pm$ 0.15	5.73 $\pm$ 0.12	5.63 $\pm$ 0.14	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.39 $\pm$ 0.36	4.93 $\pm$ 0.11	5.13 $\pm$ 0.08	6.10 $\pm$ 0.14	90 (3)
			Osm	6.19 $\pm$ 0.46	5.67 $\pm$ 0.14	5.80 $\pm$ 0.14	7.10 $\pm$ 0.12	90 (3)
		Neuron <i>dcr-1</i> KO	Ctrl	5.22 $\pm$ 0.05	5.23 $\pm$ 0.09	5.13 $\pm$ 0.08	5.30 $\pm$ 0.11	90 (3)
			Osm	5.18 $\pm$ 0.03	5.17 $\pm$ 0.12	5.13 $\pm$ 0.06	5.23 $\pm$ 0.09	90 (3)
		Intestine <i>dcr-1</i> KO	Ctrl	5.37 $\pm$ 0.18	5.30 $\pm$ 0.13	5.10 $\pm$ 0.10	5.70 $\pm$ 0.16	90 (3)
			Osm	5.51 $\pm$ 0.17	5.77 $\pm$ 0.17	5.23 $\pm$ 0.11	5.53 $\pm$ 0.15	90 (3)
13C	P0	WT	Ctrl	5.68 $\pm$ 0.19	5.93 $\pm$ 0.08	5.80 $\pm$ 0.11	5.30 $\pm$ 0.10	90 (3)
			Osm	7.03 $\pm$ 0.07	7.17 $\pm$ 0.12	7.00 $\pm$ 0.12	6.93 $\pm$ 0.13	90 (3)
		Neuron <i>drsh-1</i> KO	Ctrl	5.61 $\pm$ 0.10	5.63 $\pm$ 0.12	5.77 $\pm$ 0.15	5.43 $\pm$ 0.12	90 (3)
			Osm	5.91 $\pm$ 0.06	6.03 $\pm$ 0.12	5.90 $\pm$ 0.14	5.83 $\pm$ 0.18	90 (3)
		Intestine <i>drsh-1</i> KO	Ctrl	5.97 $\pm$ 0.18	6.23 $\pm$ 0.10	6.03 $\pm$ 0.11	5.63 $\pm$ 0.15	90 (3)
			Osm	6.94 $\pm$ 0.20	7.33 $\pm$ 0.14	6.70 $\pm$ 0.16	6.80 $\pm$ 0.14	90 (3)
	F1	WT	Ctrl	5.88 $\pm$ 0.09	5.87 $\pm$ 0.12	5.73 $\pm$ 0.14	6.03 $\pm$ 0.15	90 (3)
			Osm	6.79 $\pm$ 0.04	6.77 $\pm$ 0.15	6.73 $\pm$ 0.12	6.87 $\pm$ 0.15	90 (3)
		Neuron <i>drsh-1</i> KO	Ctrl	5.79 $\pm$ 0.05	5.80 $\pm$ 0.14	5.70 $\pm$ 0.12	5.87 $\pm$ 0.18	90 (3)
			Osm	5.86 $\pm$ 0.07	5.87 $\pm$ 0.10	5.73 $\pm$ 0.13	5.97 $\pm$ 0.15	90 (3)
		Intestine <i>drsh-1</i> KO	Ctrl	6.24 $\pm$ 0.04	6.17 $\pm$ 0.11	6.30 $\pm$ 0.12	6.21 $\pm$ 0.18	90 (3)
			Osm	6.28 $\pm$ 0.04	6.33 $\pm$ 0.11	6.30 $\pm$ 0.08	6.20 $\pm$ 0.17	90 (3)
13E	P0	WT	Ctrl	5.73 $\pm$ 0.17	5.57 $\pm$ 0.09	5.90 $\pm$ 0.12	-	60 (2)
			Osm	6.72 $\pm$ 0.25	6.47 $\pm$ 0.12	6.97 $\pm$ 0.10	-	60 (2)
		Intestine <i>dcr-1</i> KO	Ctrl	5.23 $\pm$ 0.07	5.17 $\pm$ 0.11	5.30 $\pm$ 0.10	-	60 (2)
			Osm	5.97 $\pm$ 0.20	5.77 $\pm$ 0.11	6.17 $\pm$ 0.12	-	60 (2)
		Intestine <i>drsh-1</i> KO	Ctrl	6.05 $\pm$ 0.15	5.90 $\pm$ 0.07	6.20 $\pm$ 0.13	-	60 (2)
			Osm	6.85 $\pm$ 0.18	6.67 $\pm$ 0.12	7.03 $\pm$ 0.13	-	60 (2)

次頁に続く

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.				#animals (N)
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
13E	F1	WT	Ctrl	6.00 $\pm$ 0.00	6.00 $\pm$ 0.11	6.00 $\pm$ 0.12	-	60 (2)
			Osm	6.75 $\pm$ 0.08	6.67 $\pm$ 0.10	6.83 $\pm$ 0.11	-	60 (2)
		<i>dcr-1</i> KO	Ctrl	4.63 $\pm$ 0.04	4.67 $\pm$ 0.10	4.60 $\pm$ 0.11	-	60 (2)
			No array	Osm	4.87 $\pm$ 0.04	4.83 $\pm$ 0.12	4.90 $\pm$ 0.14	-
		<i>drsh-1</i> KO	Ctrl	6.10 $\pm$ 0.40	5.70 $\pm$ 0.10	6.50 $\pm$ 0.14	-	60 (2)
			No array	Osm	6.43 $\pm$ 0.60	5.83 $\pm$ 0.10	7.03 $\pm$ 0.15	-

Figure	Generation		Condition	p-value						
				vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	vs 5	vs 6	
13B	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	0.0031	1	0.0055	0.039
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
		3	Neuron	Ctrl	0.0031	< 0.0001	-	0.0001	1	< 0.0001
				4	<i>dcr-1</i> KO	Osm	1	< 0.0001	0.0001	-
		5	Intestine	Ctrl	0.0055	< 0.0001	1	0.0002	-	< 0.0001
				6	<i>dcr-1</i> KO	Osm	0.039	< 0.0001	< 0.0001	0.6087
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	0.321	0.1211	1	1
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
		3	Neuron	Ctrl	0.321	< 0.0001	-	1	0.5552	0.021
				4	<i>dcr-1</i> KO	Osm	0.1211	< 0.0001	1	-
		5	Intestine	Ctrl	1	< 0.0001	0.5552	0.2259	-	1
				6	<i>dcr-1</i> KO	Osm	1	< 0.0001	0.021	0.0058
13C	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	1	0.0976	0.0126	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
		3	Neuron	Ctrl	1	< 0.0001	-	0.0527	0.0083	< 0.0001
				4	<i>drsh-1</i> KO	Osm	0.0976	< 0.0001	0.0527	-
		5	Intestine	Ctrl	0.0126	< 0.0001	0.0083	1	-	< 0.0001
				6	<i>drsh-1</i> KO	Osm	< 0.0001	1	< 0.0001	< 0.0001
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	1	1	0.012	0.0045
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	< 0.0001
		3	Neuron	Ctrl	1	< 0.0001	-	1	0.0019	0.0005
				4	<i>drsh-1</i> KO	Osm	1	< 0.0001	1	-
		5	Intestine	Ctrl	0.012	0.0001	0.0019	0.0043	-	1
				6	<i>drsh-1</i> KO	Osm	0.0045	< 0.0001	0.0005	0.0011

次頁に続く

Figure	Generation		Condition	p-value						
				vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	vs 5	vs 6	
13E	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	0.0001	0.2137	0.0277	< 0.0001
		2		Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	1
		3	Intestine <i>dcr-1</i> KO	Ctrl	0.0001	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
		4		Osm	0.2137	< 0.0001	< 0.0001	-	1	< 0.0001
		5	Intestine <i>drsh-1</i> KO	Ctrl	0.0277	< 0.0001	< 0.0001	1	-	< 0.0001
		6		Osm	< 0.0001	1	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	1	0.0078
		2		Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.486
		3	<i>dcr-1</i> KO No array	Ctrl	< 0.0001	< 0.0001	-	0.2416	< 0.0001	< 0.0001
		4		Osm	< 0.0001	< 0.0001	0.2416	-	< 0.0001	< 0.0001
		5	<i>drsh-1</i> KO No array	Ctrl	1	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	-	0.1228
		6		Osm	0.0078	0.486	< 0.0001	< 0.0001	0.1228	-

p値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

**Table 12.** *dcr-1* および *drsh-1* を組織特異的にノックダウンした線虫、並びに、*dcr-1* を組織特異的にレスキューした線虫の酸化ストレス耐性

Figure	Generation		Condition	Mean survival time (h) mean $\pm$ S.E.				#animals (N)	
				Total	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
14A	P0	Ctrl RNAi	Ctrl	7.00 $\pm$ 0.13	7.03 $\pm$ 0.12	6.77 $\pm$ 0.14	7.20 $\pm$ 0.14	90 (3)	
			Osm	7.88 $\pm$ 0.12	7.97 $\pm$ 0.15	7.63 $\pm$ 0.15	8.03 $\pm$ 0.14	90 (3)	
		<i>dcr-1</i> RNAi	Ctrl	7.21 $\pm$ 0.10	7.17 $\pm$ 0.11	7.07 $\pm$ 0.12	7.40 $\pm$ 0.09	90 (3)	
			Osm	7.99 $\pm$ 0.08	8.03 $\pm$ 0.14	7.83 $\pm$ 0.15	8.10 $\pm$ 0.13	90 (3)	
		<i>drsh-1</i> RNAi	Ctrl	7.32 $\pm$ 0.13	7.47 $\pm$ 0.13	7.07 $\pm$ 0.11	7.43 $\pm$ 0.11	90 (3)	
			Osm	8.01 $\pm$ 0.11	8.07 $\pm$ 0.13	7.80 $\pm$ 0.13	8.17 $\pm$ 0.13	90 (3)	
	F1	Ctrl RNAi	Ctrl	6.60 $\pm$ 0.03	6.53 $\pm$ 0.14	6.63 $\pm$ 0.14	6.63 $\pm$ 0.16	90 (3)	
			Osm	7.27 $\pm$ 0.02	7.27 $\pm$ 0.12	7.23 $\pm$ 0.14	7.30 $\pm$ 0.15	90 (3)	
		<i>dcr-1</i> RNAi	Ctrl	6.62 $\pm$ 0.03	6.57 $\pm$ 0.15	6.63 $\pm$ 0.14	6.67 $\pm$ 0.16	90 (3)	
			Osm	7.23 $\pm$ 0.04	7.30 $\pm$ 0.13	7.17 $\pm$ 0.13	7.23 $\pm$ 0.15	90 (3)	
		<i>drsh-1</i> RNAi	Ctrl	6.54 $\pm$ 0.06	6.63 $\pm$ 0.15	6.57 $\pm$ 0.12	6.43 $\pm$ 0.11	90 (3)	
			Osm	7.17 $\pm$ 0.08	7.27 $\pm$ 0.12	7.23 $\pm$ 0.12	7.00 $\pm$ 0.13	90 (3)	
14B	P0	WT	Ctrl	6.28 $\pm$ 0.06	6.20 $\pm$ 0.11	6.40 $\pm$ 0.10	6.23 $\pm$ 0.10	90 (3)	
			Osm	7.01 $\pm$ 0.06	6.90 $\pm$ 0.14	7.10 $\pm$ 0.13	7.03 $\pm$ 0.12	90 (3)	
		<i>dcr-1</i> -/-	Ctrl	6.29 $\pm$ 0.03	6.33 $\pm$ 0.13	6.30 $\pm$ 0.13	6.23 $\pm$ 0.11	90 (3)	
			Osm	6.26 $\pm$ 0.04	6.20 $\pm$ 0.12	6.33 $\pm$ 0.12	6.23 $\pm$ 0.10	90 (3)	
		Neuron <i>dcr-1</i> rescue	Ctrl	5.99 $\pm$ 0.04	6.07 $\pm$ 0.12	5.93 $\pm$ 0.14	5.97 $\pm$ 0.14	90 (3)	
			Osm	6.53 $\pm$ 0.07	6.63 $\pm$ 0.12	6.40 $\pm$ 0.15	6.57 $\pm$ 0.14	90 (3)	
		Neuron & Intestine <i>dcr-1</i> rescue	Ctrl	6.00 $\pm$ 0.06	6.00 $\pm$ 0.11	5.90 $\pm$ 0.14	6.10 $\pm$ 0.12	90 (3)	
			Osm	6.54 $\pm$ 0.06	6.57 $\pm$ 0.11	6.43 $\pm$ 0.11	6.63 $\pm$ 0.12	90 (3)	
		F1	WT	Ctrl	6.26 $\pm$ 0.04	6.23 $\pm$ 0.10	6.33 $\pm$ 0.12	6.20 $\pm$ 0.11	90 (3)
				Osm	6.83 $\pm$ 0.10	6.73 $\pm$ 0.11	7.03 $\pm$ 0.12	6.73 $\pm$ 0.12	90 (3)
			<i>dcr-1</i> -/-	Ctrl	6.04 $\pm$ 0.07	5.90 $\pm$ 0.12	6.10 $\pm$ 0.15	6.13 $\pm$ 0.11	90 (3)
				Osm	6.06 $\pm$ 0.13	5.87 $\pm$ 0.09	6.30 $\pm$ 0.11	6.00 $\pm$ 0.08	90 (3)
	Neuron <i>dcr-1</i> rescue		Ctrl	5.97 $\pm$ 0.12	5.73 $\pm$ 0.13	6.07 $\pm$ 0.11	6.10 $\pm$ 0.10	90 (3)	
			Osm	5.89 $\pm$ 0.20	5.50 $\pm$ 0.11	6.10 $\pm$ 0.11	6.07 $\pm$ 0.09	90 (3)	
	Neuron & Intestine <i>dcr-1</i> rescue	Ctrl	5.91 $\pm$ 0.09	5.73 $\pm$ 0.10	6.03 $\pm$ 0.10	5.97 $\pm$ 0.11	90 (3)		
		Osm	6.32 $\pm$ 0.06	6.20 $\pm$ 0.14	6.40 $\pm$ 0.13	6.37 $\pm$ 0.11	90 (3)		

次頁に続く

Figure	Generation			Condition	p-value					
					vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	vs 5	vs 6
14A	P0	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	< 0.0001	0.4111	< 0.0001	0.0301	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	1	< 0.0001	1
		3	<i>dcr-1</i> RNAi	Ctrl	0.4111	< 0.0001	-	< 0.0001	1	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	1	< 0.0001	-	< 0.0001	1
		5	<i>drsh-1</i> RNAi	Ctrl	0.0301	< 0.0001	1	< 0.0001	-	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	1	< 0.0001	1	< 0.0001	-
	F1	1	Ctrl RNAi	Ctrl	-	< 0.0001	1	< 0.0001	1	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	1	< 0.0001	1
		3	<i>dcr-1</i> RNAi	Ctrl	1	< 0.0001	-	< 0.0001	1	0.0001
				Osm	< 0.0001	1	< 0.0001	-	< 0.0001	1
		5	<i>drsh-1</i> RNAi	Ctrl	1	< 0.0001	1	< 0.0001	-	< 0.0001
				Osm	< 0.0001	1	0.0001	1	< 0.0001	-

Figure	Generation			Condition	p-value							
					vs 1	vs 2	vs 3	vs 4	vs 5	vs 6	vs 7	Vs 8
14B	P0	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	1	1	0.0862	0.0344	0.0422	0.0235
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0003	< 0.0001	< 0.0001
		3	<i>dcr-1</i> -/-	Ctrl	1	< 0.0001	-	1	0.0579	0.1187	0.0312	0.1012
				Osm	1	< 0.0001	1	-	0.1433	0.0304	0.0808	0.0217
		5	Neuron <i>dcr-1</i> rescue	Ctrl	0.0862	< 0.0001	0.0579	0.1433	-	< 0.0001	1	< 0.0001
				Osm	0.0344	0.0003	0.1187	0.0304	< 0.0001	-	< 0.0001	1
		7	Neuron & Intestine <i>dcr-1</i> rescue	Ctrl	0.0422	< 0.0001	0.0312	0.0808	1	< 0.0001	-	< 0.0001
				Osm	0.0235	< 0.0001	0.1012	0.0217	< 0.0001	1	< 0.0001	-
	F1	1	WT	Ctrl	-	< 0.0001	0.3978	0.1313	0.0306	0.0017	0.0016	1
				Osm	< 0.0001	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
		3	<i>dcr-1</i> -/-	Ctrl	0.3978	< 0.0001	-	1	1	0.8021	0.9839	0.0899
				Osm	0.1313	< 0.0001	1	-	1	0.6171	0.7337	0.0234
		5	Neuron <i>dcr-1</i> rescue	Ctrl	0.0306	< 0.0001	1	1	-	1	1	0.0051
				Osm	0.0017	< 0.0001	0.8021	0.6171	1	-	1	0.0003
		7	Neuron & Intestine <i>dcr-1</i> rescue	Ctrl	0.0016	< 0.0001	0.9839	0.7337	1	1	-	0.0003
				Osm	1	< 0.0001	0.0899	0.0234	0.0051	0.0003	0.0003	-

p値は log-rank 検定により算出し Bonferroni 法で補正した。#は実験で使用した線虫の総数、N は実験回を示す。

## 考察

本研究において私は、低用量の浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得および継承に、small RNA の組織間コミュニケーションが必要であることを明らかにした。先行研究から、親世代の環境ストレス誘導性のストレス耐性の上昇は、組織間コミュニケーションを介して、子世代に受け継がれることが知られていた(Kishimoto *et al.*, 2017)。しかしながら、組織間コミュニケーションを担う分子機構について、その大部分が明らかではなかった。本研究では、germline nuclear RNAi 経路が浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の継承に関与することを示した。これは、RNAi が germline nuclear RNAi 経路を介して、数世代にわたり遺伝子のサイレンシングを維持し続けるという先行研究(Buckley *et al.*, 2012; Burton *et al.*, 2011)と矛盾しない結果である。さらに本研究は、浸透圧刺激による酸化ストレス耐性の獲得に、miRNA 経路が関与する一方で、酸化ストレス耐性の継承には、endo-siRNA および miRNA 経路の両方が関与することを明らかにした。いくつかの miRNA が熱ショックやウイルス感染といった、ストレス応答に関与していることが報告されていることから(Leung & Sharp, 2010)、endo-siRNA だけでなく miRNA が、環境ストレスによって引き起こされるストレス耐性の獲得および継承において機能することは、合理的だといえる。世代を越えた獲得形質の継承に、1 種類の small RNA 経路が関与することを示唆する研究はいくつか報告されているが(Moore *et al.*, 2019; Posner *et al.*, 2019)、2 種類の small RNA 経路が一部機能を重複しながらも、それぞれ異なる機能を果たしながらストレス耐性を継承することは、新たな知見である。

本研究はさらに、生殖腺ではなく腸組織での miRNA の生成と、腸組織もしくは生殖腺内の endo-siRNA の機能が、ストレス耐性の継承に重要であることを示唆した。本研究では、雌雄同体の線虫を用いて実験を行っていることから、母体の small RNA が腸

から胚に直接伝達される可能性が考えられる。しかしながら、本研究において、ストレス耐性の継承に **germline Argonaute HRDE-1** が必要であることが示唆されたことから、ストレス耐性の世代間の継承は、腸組織と生殖腺間の **small RNA** のシグナル伝達によって制御されていると考えられる。この考えは、ストレスを与えたオス親からも形質が継承されたという先行研究の報告と一致する(Kishimoto *et al.*, 2017)。

腸組織の **miRNA** と腸組織および生殖腺内の **endo-siRNA** がストレス耐性の継承に必要なことから、腸組織の **miRNA** が腸組織および生殖腺内の **endo-siRNA** を制御している可能性が示唆された。このことは、**miRNA** と **endo-siRNA** はクロストークすることで、親が経験した環境からの情報を子孫に伝えていると考えられる。特定の **miRNA** が **endo-siRNA** の増幅を制御していることや(Corrêa *et al.*, 2010)、**miRNA** 構成因子である **GW182** や **endo-siRNA** および **piRNA** 経路に関する **Argonaute**、さらには **small RNA** 自体が、**cytoplasmic processing bodies (P-bodies)** や **ストレス顆粒** などの **RNA** 顆粒内に凝集していることが知られている(Pontes and Pikaard, 2008; Anderson and Kedersha, 2009)。このことから、**RNA** 顆粒が、**miRNA** と **endo-siRNA** クロストークの場である可能性が考えられる。世代を越えたストレス耐性の継承において、どのように **small RNA** が相互作用しているかを明らかにしていくことが今後の課題である。

本研究から、親世代の浸透圧刺激による酸化ストレス耐性は、以下の3つのステップによって次世代へ継承されると考えられる(Figure 14)。

#### ① 親世代におけるストレス耐性の獲得

親世代が酸化ストレス耐性の上昇を示すには、神経の **DCR-1** および **DRSH-1** と腸の **SID-1** が必要とされることがわかった。これまでに、神経伝達物質が神経以外の組織の機能を制御することや(Noble *et al.*, 2013; Ooi & Prahlad, 2017)、高浸透圧への適応や酸化ストレスへの応答に、腸組織が中心的な役割を担っていることが報告されている

(Lamitina *et al.*, 2006; Wheeler & Thomas, 2006; An & Blackwell, 2003)。したがって、低用量の浸透圧刺激に応答して神経で miRNA が生成され、miRNA が神経から腸へ伝達されることで、親世代の酸化ストレスの耐性が上昇すると考えられる。

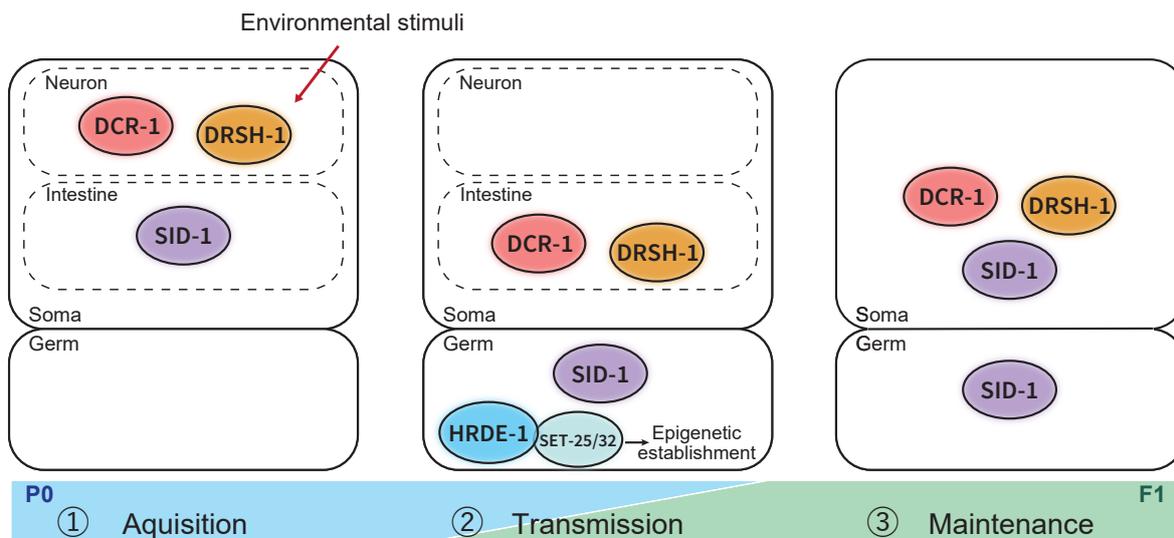
### ② 親世代から子世代へのストレス耐性の継承

ストレス耐性の継承には、腸の DCR-1 と DRSH-1、生殖腺の SID-1、germline nuclear RNAi の構成因子が必要であることがわかった。このことは、腸で生成された miRNA と endo-siRNA が生殖腺へと伝達され、そこで germline nuclear RNAi 経路を介したヒストン修飾を通じて、親から子へとストレス耐性が継承されることが考えられる。近年の研究から、腸と生殖腺の相互作用が、寿命や個体のストレス耐性を制御していることが明らかにされつつある(Lynn *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2017; Nono *et al.*, 2020)。したがって、酸化ストレス耐性の世代を越えた継承においても、腸と生殖腺が互いに連携しながら機能していることが示唆される。

### ③ 子世代におけるストレス耐性の維持

親から伝えられたストレス耐性情報の維持には、子世代の DCR-1、DRSH-1、SID-1 が必要とされることがわかった。よって、small RNA の生成と small RNA の組織間コミュニケーションが、子世代のストレス耐性上昇を引き起こすと考えられる。

本研究で得られた結果より、親世代が経験した環境情報を、エピジェネティック情報に変換することで、親が獲得した形質を子孫へと伝える生存戦略の一端を明らかにした。Small RNA 経路は、線虫からマウス、ヒトに至るまで広く保存されているため、当該分野の他の生物種による研究に対しても、重要な知見となり得る。



**Figure 15. 低用量ストレスによる酸化ストレス耐性の獲得および継承のモデル図**

①浸透圧刺激に反応して、神経で生成された miRNA が腸に伝達されることで親世代のストレス耐性が上昇する。②腸で生成された miRNA と endo-siRNA が生殖腺へと伝達され、germline nuclear RNAi 経路を介したヒストン修飾を介して、ストレス耐性が親から子へと伝えられる。③子世代では small RNA の組織間コミュニケーションによりストレス耐性が上昇する。

# 材料と方法

## 線虫 *C. elegans* の株と飼育

実験に用いた線虫 *C. elegans* の株を以下に示す。

N2: WT, PD8753: *dcr-1(ok247) III / hT2[bli-4(e937)let-?(q782)qIs48] (I; III)*, *dcr-1(tm12491) III*, WM191: MAGO12 mutant, VC1138: *drsh-1(ok369) I / hT2[bli-4(e937)let-?(q782)qIs48] (I; III)*, YY538: *hrde-1(tm1200) III*, YY160: *nrde-1(gg88) III*, YY156: *nrde-2(gg95) II*, YY453: *nrde-4(gg129) IV*, MT17463: *set-25(n5021) III*, VC967: *set-32(ok1457) I*, *set-25(n5021) III;set-32(ok1457) I*, HC196: *sid-1(qt9) V*, VP303: *rde-1(ne219) V; kbIs7[nhx-2p::rde-1; rol-6(su1006)]*, DCL569: *mkcSi13 [sun-1p::rde-1::sun-1 3'UTR + unc-119(+)] II*; *rde-1(mkc36) V*, *kyEx1901[pCFJ90(myo-2p::mCherry); eft-3p::Cas9; U6p::dcr-1-sgRNA]*, *kyEx1902[pCFJ90(myo-2p::mCherry); rgef-1p::Cas9; U6p::dcr-1-sgRNA]*, *kyEx1903[pCFJ90(myo-2p::mCherry); gly-19p::Cas9; U6p::dcr-1-sgRNA]*, *kyEx1911[pCFJ90(myo-2p::mCherry); eft-3p::Cas9; U6p::drsh-1-sgRNA]*, *kyEx1912[pCFJ90(myo-2p::mCherry); rgef-1p::Cas9; U6p::drsh-1-sgRNA]*, *kyEx1913[pCFJ90(myo-2p::mCherry); gly-19p::Cas9; U6p::drsh-1-sgRNA]*, *kyEx1921[pCFJ90(myo-2p::mCherry); rgef-1p::Cas9; U6p::dcr-1-sgRNA]; sur-5p::NLS::wGxxFP dcr-1]*, *kyEx1922[pCFJ90(myo-2p::mCherry); gly-19p::Cas9; U6p::dcr-1-sgRNA]; sur-5p::NLS::wGxxFP dcr-1]*, *kyEx1923[pCFJ90(myo-2p::mCherry); rgef-1p::Cas9; U6p::drsh-1-sgRNA]; sur-5p::NLS::wGxxFP drsh-1]*, *kyEx1924[pCFJ90(myo-2p::mCherry); gly-19p::Cas9; U6p::drsh-1-sgRNA]; sur-5p::NLS::wGxxFP drsh-1]*

線虫は、NGM プレート上で大腸菌 OP-50 を餌として 20°C で飼育、継代した。NGM プレートや M9 バッファーの組成、その他線虫の取り扱いに関しては標準的な方法に従った (Brenner, 1974)。

### 浸透圧ストレス条件での飼育

NGM プレート上で飼育した成虫は M9 バッファーを用いて回収したのち、4M NaOH および次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で溶解して、卵を取り出した (Sulston *et al.*, 1974)。同期した卵を、高濃度の NaCl (150 mM) を添加した NGM プレート上で、Day 2 adulthood までの 4 日間飼育した。各実験では、ストレスを与えずに飼育した線虫をコントロール群として使用した。子世代の線虫は、親となる世代の線虫から卵を回収したのち、通常の NGM プレートを用いて非ストレス条件下で飼育した。

### 酸化ストレス耐性の測定

酸化ストレス耐性の測定では、M9 バッファーで希釈した過酸化水素水 20  $\mu$ l (濃度は Figure legend に記載) を 60 穴プレートに添加したものを用意し、Day 2 adulthood の線虫を 1 条件につき 30 匹ずつ入れて生存率を測定した。生死判定は 1 時間ごとに、白金線で線虫を突いて反応を示すかどうかで判断をした。

### RNAi

Kamath らの方法を参考に、feeding 法により RNAi を行った (Kamath *et al.*, 2001)。

RNAi クローン (*hrde-1*) は以下のプライマーを用いて作製した。

*hrde-1* Fw: 5'-AATTGAGCTCAAGATATTCTCCGCGACAAC-3'

*hrde-1* Rv: 5'-AATTGGTACCGCAGGCCAATCGATTCTCA-3'

それ以外の RNAi クローン (*dcr-1*, *drsh-1*, *sid-1*) は、*C. elegans* RNAi library (Source

BioScience)内のものを使用した。

## 定量的 RT-PCR

RNAの抽出は、凍結した線虫からTrizol (Invitrogen)を用いて行った。抽出したtotal RNAからReverTra Ace qPCR RT master Mix with gDNA remover (TOYOBO)を用いて、プロトコールに従いsingle strand cDNAを合成した。合成したcDNAに対して、SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)を用いて、QuantStudio®3 Real-Time PCR system (Applied Biosystems)により定量的RT-PCRを行った。解析においては、ハウスキーピング遺伝子である*act-1*の発現量をもとにノーマライズを行った。

## トランスジェニック線虫の作成

Shen らの方法を参考に、CRISPR/Cas9 システムによりトランスジェニック線虫を作成した(Shen *et al.*, 2014)。CRISPR/Cas9 ベクターは Addgene のものを使用し(#47549)、ベクターの *eft-3* プロモーターを組織特異的プロモーターに置き換えることで組織特異的に Cas9 エンドヌクレアーゼを発現させた。sgRNA の標的配列は CRISPR design tool (<http://crispr.edu>) を用いて設計した。使用したプライマー配列を以下に示す。

*dcr-1* sgRNA #1 Fw: 5'-TGTTGACTGTACGATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC-3'

*dcr-1* sgRNA #1 Rv: 5'-TCGTACAGTCAACAATCCAAGAACATCTCGCAATAGGA-3'

*dcr-1* sgRNA #2 Fw: 5'-GCACCATTGGATCAGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC-3'

*dcr-1* sgRNA #2 Rv: 5'-TGATCCAATGGTGCAAACAAGAACATCTCGCAATAGGA-3'

*drsh-1* sgRNA #1 Fw: 5'-TTTGAGCATCACAAAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC-3'

*drsh-1* sgRNA #1 Rv: 5'-TTGTGATGCTCAAATTGCAAGAACATCTCGCAATAGGA-3'

*drsh-1* sgRNA #2 Fw: 5'-AACAGACATGTAATCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC-3'

*drsh-1* sgRNA #2 Rv: 5'-ATTACATGTCTGTTTCTCAAGAACATCTCGCAATAGGA-3'

ノックアウトの組織特異性の確認では、EGxxFP システムを使用した(Mashiko *et al.*, 2013)。pPD95.75 を使用し、核移行シグナルの下流に、*dcr-1* または *drsh-1* sgRNA ターゲット配列を内部に挿入した wGxxFP(NLS::wGxxFP)を発現するプラスミドを作成した。wGxxFP の発現には、*sur-5* プロモーターを使用した。使用したプライマーを以下に示す。

wGxxFP insert Fw: 5'-AATTGGACTAACCCCTGATTATTTAAAT-3'

wGxxFP insert Rv: 5'-GCCCGTACGGCCGACTAGTA-3'

wGxxFP vector Fw: 5'-GTCGGCCGTACGGGCCCTTT-3'

wGxxFP vector Rv: 5'-AGGGTTAGTCCAATTTGTGTCCAAGAAT-3'

wGxxFP *dcr-1* #1 Fw: 5'-CATCGTACAGTCAACAATCCTAACCCCTGATTATTTAAAT-3'

wGxxFP *dcr-1* #1 Rv: 5'-GTTGACTGTACGATGGCGGTCCAATTTGTGTCCAAGAAAT-3'

wGxxFP *dcr-1* #2 Fw: 5'-CACCATTGGATCAGGGTGGACTTGTCCTACTTTCTGT-3'

wGxxFP *dcr-1* #2 Rv: 5'-CCTGATCCAATGGTGCAAATCCAATTTGTGTCCAAGAAAT-3'

wGxxFP *drsh-1* #1 Fw: 5'-CTTTGTGATGCTCAAATTTCTAACCCCTGATTATTTAAAT

T-3'

wGxxFP *drsh-1*#1 Rv: 5'TGAGCATCACAAAGGCGGTCCAATTTGTGTCCAAGAAT

G-3'

wGxxFP *drsh-1*#2 Fw: 5'ACAGACATGTAATCGGAGGCTAACCCCTGATTATTTAAA

T-3'

wGxxFP *drsh-1*#2 Rev: 5'CGATTACATGTCTGTTTCTTCCAATTTGTGTCCAAGAA

T-3'

*dcr-1* のレスキュー実験では、*dcr-1* 変異体 (*tm12491*) に、神経特異的 *rgef-1* プロモーターまたは腸特異的 *gly-19* プロモーターを用いて、全長 *dcr-1* cDNA::*gfp* の融合遺伝子を発現させた。使用したプライマーを今に示す。

*dcr-1* rescue Fw: 5'-AATTCCCGGGATGGTCAGGGTAAGAGCTGA-3'

*dcr-1* rescue Rv: 5'-AATTGGTACCCTAACAGTTGTTAATGTTAATGATGGGC -3'

### NLS::wGFP の顕微鏡観察

Adult の線虫を 2 mM レバミゾールで麻痺させ、2%アガロースパッド上に置き、stereomicroscope SZX16 (Olympus) で観察、撮影を行った。

### 統計解析

Unpaired Student's *t*-test は、Excel (Microsoft) を用いて行った。Log-rank test は、Online Application for the Survival Analysis 2 (OASIS2) (Yang *et al.*, 2011) を用いた。多重比較の場合は、Bonferroni 法で *P* 値を補正した。*P* 値が 0.05 未満を統計的に有意とみなした。

## 参考文献

An, J.H., and Blackwell, T.K. (2003). SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev* *17*, 1882-1893.

Anderson, P., and Kedersha, N. (2009). RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 430-436.

Arantes-Oliveira, N., Apfeld, J., Dillin, A., and Kenyon, C. (2002). Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *295*, 502-505.

Ashe, A., Sapetschnig, A., Weick, E.M., Mitchell, J., Bagijn, M.P., Cording, A.C., Doebley, A.L., Goldstein, L.D., Lehrbach, N.J., Le Pen, J., *et al.* (2012). piRNAs can trigger a multigenerational epigenetic memory in the germline of *C. elegans*. *Cell* *150*, 88-99.

Atlasi, Y., and Stunnenberg, H.G. (2017). The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. *Nat Rev Genet* *18*, 643-658.

Bargmann, C.I. (2006). Chemosensation in *C. elegans*. *WormBook*, 1-29.

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71-94.

Buckley, B.A., Burkhart, K.B., Gu, S.G., Spracklin, G., Kershner, A., Fritz, H., Kimble, J., Fire, A., and Kennedy, S. (2012). A nuclear Argonaute promotes multigenerational epigenetic inheritance and germline immortality. *Nature* *489*, 447-451.

Burkhart, K.B., Guang, S., Buckley, B.A., Wong, L., Bochner, A.F., and Kennedy, S. (2011). A pre-mRNA-associating factor links endogenous siRNAs

to chromatin regulation. *PLoS Genet* 7, e1002249.

Burton, N.O., Burkhart, K.B., and Kennedy, S. (2011). Nuclear RNAi maintains heritable gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19683-19688.

Carone, B.R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J.M., Hart, C.E., Li, R., Bock, C., Li, C., Gu, H., Zamore, P.D., *et al.* (2010). Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 143, 1084-1096.

Corrêa, R.L., Steiner, F.A., Berezikov, E., and Ketting, R.F. (2010). MicroRNA-directed siRNA biogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 6, e1000903.

Cypser, J.R., and Johnson, T.E. (2002). Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57, B109-114.

Duchaine, T.F., Wohlschlegel, J.A., Kennedy, S., Bei, Y., Conte, D., Pang, K., Brownell, D.R., Harding, S., Mitani, S., Ruvkun, G., *et al.* (2006). Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell* 124, 343-354.

Espelt, M.V., Estevez, A.Y., Yin, X., and Strange, K. (2005). Oscillatory Ca<sup>2+</sup> signaling in the isolated *Caenorhabditis elegans* intestine: role of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor and phospholipases C beta and gamma. *J Gen Physiol* 126, 379-392.

Fischer, S.E., Montgomery, T.A., Zhang, C., Fahlgren, N., Breen, P.C., Hwang, A., Sullivan, C.M., Carrington, J.C., and Ruvkun, G. (2011). The ERI-6/7 helicase acts at the first stage of an siRNA amplification pathway that targets recent gene duplications. *PLoS Genet* 7, e1002369.

Gammon, D.B., Ishidate, T., Li, L., Gu, W., Silverman, N., and Mello, C.C. (2017). The Antiviral RNA Interference Response Provides Resistance to

Lethal Arbovirus Infection and Vertical Transmission in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* *27*, 795-806.

Gems, D., and Partridge, L. (2008). Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger". *Cell Metab* *7*, 200-203.

González-Aguilera, C., Palladino, F., and Askjaer, P. (2014). *C. elegans* epigenetic regulation in development and aging. *Brief Funct Genomics* *13*, 223-234.

Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* *106*, 23-34.

Gu, W., Shirayama, M., Conte, D., Vasale, J., Batista, P.J., Claycomb, J.M., Moresco, J.J., Youngman, E.M., Keys, J., Stoltz, M.J., *et al.* (2009). Distinct argonaute-mediated 22G-RNA pathways direct genome surveillance in the *C. elegans* germline. *Mol Cell* *36*, 231-244.

Guang, S., Bochner, A.F., Burkhart, K.B., Burton, N., Pavelec, D.M., and Kennedy, S. (2010). Small regulatory RNAs inhibit RNA polymerase II during the elongation phase of transcription. *Nature* *465*, 1097-1101.

Han, S., Schroeder, E.A., Silva-García, C.G., Hebestreit, K., Mair, W.B., and Brunet, A. (2017). Mono-unsaturated fatty acids link H3K4me3 modifiers to *C. elegans* lifespan. *Nature* *544*, 185-190.

Hoogstrate, S.W., Volkers, R.J., Sterken, M.G., Kammenga, J.E., and Snoek, L.B. (2014). Nematode endogenous small RNA pathways. *Worm* *3*, e28234.

Igual Gil, C., Jarius, M., von Kries, J.P., and Rohlfing, A.K. (2017). Neuronal Chemosensation and Osmotic Stress Response Converge in the Regulation of. *Front Physiol* *8*, 380.

Jose, A.M., Smith, J.J., and Hunter, C.P. (2009). Export of RNA silencing from

*C. elegans* tissues does not require the RNA channel SID-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 2283-2288.

Kadandale, P., Chatterjee, I., and Singson, A. (2009). Germline transformation of *Caenorhabditis elegans* by injection. *Methods Mol Biol* *518*, 123-133.

Kalinava, N., Ni, J.Z., Peterman, K., Chen, E., and Gu, S.G. (2017). Decoupling the downstream effects of germline nuclear RNAi reveals that H3K9me3 is dispensable for heritable RNAi and the maintenance of endogenous siRNA-mediated transcriptional silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Epigenetics Chromatin* *10*, 6.

Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G., and Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* *2*, RESEARCH0002.

Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 126-139.

Kishimoto, S., Uno, M., Okabe, E., Nono, M., and Nishida, E. (2017). Environmental stresses induce transgenerationally inheritable survival advantages via germline-to-soma communication in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* *8*, 14031.

Klosin, A., Casas, E., Hidalgo-Carcedo, C., Vavouri, T., and Lehner, B. (2017). Transgenerational transmission of environmental information in *C. elegans*. *Science* *356*, 320-323.

Kumsta, C., Chang, J.T., Schmalz, J., and Hansen, M. (2017). Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and proteostasis in *C. elegans*. *Nat Commun* *8*, 14337.

Lamitina, T., Huang, C.G., and Strange, K. (2006). Genome-wide RNAi screening identifies protein damage as a regulator of osmoprotective gene

expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 12173-12178.

Lee, R.C., Hammell, C.M., and Ambros, V. (2006). Interacting endogenous and exogenous RNAi pathways in *Caenorhabditis elegans*. *RNA* *12*, 589-597.

Leung, A.K., and Sharp, P.A. (2010). MicroRNA functions in stress responses. *Mol Cell* *40*, 205-215.

Lynn, D.A., Dalton, H.M., Sowa, J.N., Wang, M.C., Soukas, A.A., and Curran, S.P. (2015). Omega-3 and -6 fatty acids allocate somatic and germline lipids to ensure fitness during nutrient and oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 15378-15383.

Mashiko, D., Fujihara, Y., Satouh, Y., Miyata, H., Isotani, A., and Ikawa, M. (2013). Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep* *3*, 3355.

Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D., and Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* *10*, 3959-3970.

Montgomery, T.A., Rim, Y.S., Zhang, C., Downen, R.H., Phillips, C.M., Fischer, S.E., and Ruvkun, G. (2012). PIWI associated siRNAs and piRNAs specifically require the *Caenorhabditis elegans* HEN1 ortholog henn-1. *PLoS Genet* *8*, e1002616.

Noble, T., Stieglitz, J., and Srinivasan, S. (2013). An integrated serotonin and octopamine neuronal circuit directs the release of an endocrine signal to control *C. elegans* body fat. *Cell Metab* *18*, 672-684.

Nono, M., Kishimoto, S., Sato-Carlton, A., Carlton, P.M., Nishida, E., and Uno, M. (2020). Intestine-to-Germline Transmission of Epigenetic Information Intergenerationally Ensures Systemic Stress Resistance in *C. elegans*. *Cell Rep* *30*, 3207-3217.e3204.

Ooi, F.K., and Prahlad, V. (2017). Olfactory experience primes the heat shock

transcription factor HSF-1 to enhance the expression of molecular chaperones in *C. elegans*. *Sci Signal* *10*.

Pontes, O., and Pikaard, C.S. (2008). siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. *Curr Opin Genet Dev* *18*, 197-203.

Posner, R., Toker, I.A., Antonova, O., Star, E., Anava, S., Azmon, E., Hendricks, M., Bracha, S., Gingold, H., and Rechavi, O. (2019). Neuronal Small RNAs Control Behavior Transgenerationally. *Cell* *177*, 1814-1826.e1815.

Seong, K.H., Li, D., Shimizu, H., Nakamura, R., and Ishii, S. (2011). Inheritance of stress-induced, ATF-2-dependent epigenetic change. *Cell* *145*, 1049-1061.

Shen, Z., Zhang, X., Chai, Y., Zhu, Z., Yi, P., Feng, G., Li, W., and Ou, G. (2014). Conditional knockouts generated by engineered CRISPR-Cas9 endonuclease reveal the roles of coronin in *C. elegans* neural development. *Dev Cell* *30*, 625-636.

Spracklin, G., Fields, B., Wan, G., Becker, D., Wallig, A., Shukla, A., and Kennedy, S. (2017). The RNAi Inheritance Machinery of. *Genetics* *206*, 1403-1416.

Sulston, J.E., and Brenner, S. (1974). The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 95-104.

Tatum, M.C., Ooi, F.K., Chikka, M.R., Chauve, L., Martinez-Velazquez, L.A., Steinbusch, H.W.M., Morimoto, R.I., and Prahlad, V. (2015). Neuronal serotonin release triggers the heat shock response in *C. elegans* in the absence of temperature increase. *Curr Biol* *25*, 163-174.

TeKippe, M., and Aballay, A. (2010). *C. elegans* germline-deficient mutants respond to pathogen infection using shared and distinct mechanisms. *PLoS One* *5*, e11777.

van Oosten-Hawle, P., Porter, R.S., and Morimoto, R.I. (2013). Regulation of organismal proteostasis by transcellular chaperone signaling. *Cell* *153*, 1366-1378.

Vasale, J.J., Gu, W., Thivierge, C., Batista, P.J., Claycomb, J.M., Youngman, E.M., Duchaine, T.F., Mello, C.C., and Conte, D. (2010). Sequential rounds of RNA-dependent RNA transcription drive endogenous small-RNA biogenesis in the ERGO-1/Argonaute pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 3582-3587.

Wheeler, J.M., and Thomas, J.H. (2006). Identification of a novel gene family involved in osmotic stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *174*, 1327-1336.

Winston, W.M., Molodowitch, C., and Hunter, C.P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* *295*, 2456-2459.

Woodhouse, R.M., Buchmann, G., Hoe, M., Harney, D.J., Low, J.K.K., Larance, M., Boag, P.R., and Ashe, A. (2018). Chromatin Modifiers SET-25 and SET-32 Are Required for Establishment but Not Long-Term Maintenance of Transgenerational Epigenetic Inheritance. *Cell Rep* *25*, 2259-2272.e2255.

Yigit, E., Batista, P.J., Bei, Y., Pang, K.M., Chen, C.C., Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M.J., and Mello, C.C. (2006). Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* *127*, 747-757.

Zou, L., Wu, D., Zang, X., Wang, Z., Wu, Z., and Chen, D. (2019). Construction of a germline-specific RNAi tool in *C. elegans*. *Sci Rep* *9*, 2354.

# 謝辞

本研究を進めるにあたり、博士課程から現在に至るまで終始ご指導・ご助言を賜りました理化学研究所・生命機能科学研究センター・センター長の西田栄介先生(元京都大学大学院生命科学研究科教授)に深謝の意を表します。西田研究室という素晴らしい環境で研究に従事させていただきましたことに厚く御礼申し上げます。また、研究室においてご指導・ご助言頂きました日下部杜央講師に感謝の意を表します。また、研究生活全般にわたり、多大なるご支援を頂きました宇野雅晴博士に心より御礼申し上げます。さらに、本研究において実験のサポートをしていただきました岸本沙耶博士に感謝いたします。ならびに、日頃から数々のご教示ご助言を賜りました西田研究室の皆さまに深く感謝いたします。

最後に、今日に至るまで私を温かく見守り、そして支え続けていただきました家族に心からの感謝の意を表して謝辞といたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Emiko Okabe, Masaharu Uno, Saya Kishimoto and Eisuke Nishida

Intertissue small RNA communication mediates the acquisition and inheritance of hormesis in *Caenorhabditis elegans*

*Communications Biology*, in press, doi: 10.1038/s42003-021-01692-3, 2021