

エピジェネティック制御因子による
酸化ストレス耐性の制御における
組織間コミュニケーションの解明

農野 将功

目次

要旨	2
略語表	4
第一章 序論	5
第二章 結果	
2-1	9
2-2	19
2-3	28
2-4	32
第三章 考察	58
材料・方法	62
文献	68
謝辞	74

要旨

エピジェネティクスは、DNA やヒストンへの後天的な化学修飾を通して遺伝子発現が制御される仕組みである。近年の研究によって、エピジェネティクスが酸化ストレス耐性を含む生体の恒常性維持に深く関与することが明らかになりつつある。しかし、個体全身の酸化ストレス耐性の制御において、個体のどの組織でエピジェネティクスの変化が起きることが重要であるか、また各組織がどのように連携して酸化ストレス耐性を制御しているかについては、未だその多くが明らかではない。本研究において私は、線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた解析から、エピジェネティック情報を伝達する腸-生殖腺の組織間コミュニケーションが、個体の酸化ストレス耐性を制御することを見出した。線虫のヒストン H3K4 トリメチル化修飾因子である *ash-2* を腸組織及び生殖腺で欠損させると酸化ストレス耐性が上昇し、ヒストン H3K4 脱メチル化酵素 *rbr-2* をそれぞれ同一組織で同時にノックダウンすることでその効果が抑制されることを見出した。さらに、腸組織の *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性の上昇が、生殖腺の *rbr-2* のノックダウンによって抑制されることも明らかになった。また、腸組織で *ash-2* を欠損した線虫の生殖腺において、ヒストン H3K4 トリメチル化レベルが減少することが分かった。これらの結果から、腸から生殖腺へとエピジェネティック情報を伝達する機構が存在し、この組織間コミュニケーションが個体の酸化ストレス耐性を上昇させることが分かった。さらに興味深いことに、腸組織で *ash-2* を欠損した親世代の個体から産まれてきた子世代において、酸化ストレス耐性の上昇が見られた。この結果から、親世代の生殖腺におけるエピジェネティック変化を介して酸化ストレス耐性上昇が次世代へと継承されることが明らかになった。次に、腸-生殖腺の組織間コミュニケーションを担う分子メカニズムを解析した結果、腸組織における転写因子 DAF-16 が、腸組織の *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性上昇と、次世代への継承の両方に必要であることが分

かった。さらに、マイクロアレイを用いて、腸組織で *ash-2* をノックダウンした際に発現が変化した遺伝子を抽出し、酸化ストレス耐性上昇への寄与を調べた。その結果、腸組織での *ash-2* ノックダウンにより発現が減少した遺伝子 *F08F1.3* を腸組織で欠損すると、個体の酸化ストレス耐性が上昇し、その効果が次世代へと継承されることを見出した。以上の結果から、私は次のような組織間コミュニケーションの分子機構を提唱する。(1)腸組織で *ash-2* を欠損すると、転写因子 DAF-16 の機能や *F08F1.3* の発現低下を介して腸組織から生殖腺へと情報が伝わり、(2)生殖腺において RBR-2 の働きによりヒストン H3K4 脱メチル化が生じることで個体の酸化ストレス耐性が上昇し、(3)生殖腺で生じたエピジェネティック変化を介して酸化ストレス耐性上昇が子世代へと継承される。本研究により、エピジェネティック情報を伝達する腸・生殖腺の組織間コミュニケーションによる個体の酸化ストレス耐性制御メカニズムの一端が明らかになった。

略語表

cDNA: complementary DNA

ChIP-seq: chromatin immunoprecipitation-sequencing

GFP: green fluorescent protein

IGF: insulin-like growth factor

NGM: normal growth medium

PCR: polymerase chain reaction

RNAi: RNA interference

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

SiRNA: small interfering RNA

T7E1: T7 Endonuclease I

YA: young adult

序論

生物は、遺伝要因や環境要因による内外の変化に対して生体を維持していくために適切な応答を行っている(Benayoun et al., 2015; López-Otín et al., 2013; Riera et al., 2016)。近年の研究によって、個体の恒常性維持にエピジェネティクスの制御機構が深く関与することが明らかになりつつある(Benayoun et al., 2015)。エピジェネティクスとは、DNA やヒストンへの後天的な化学修飾を通して、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現が制御される仕組みのことを指す。具体的には、DNA メチル化酵素群や、ヒストン修飾酵素群(メチル化やアセチル化など)、クロマチン構造調節因子、non-coding RNA など、様々な機能を持つ因子が協調的あるいは対立的に働くことで遺伝子発現を制御している。エピジェネティクス制御機構は、様々な生命現象の分子基盤を担っている。例として、エピジェネティックな遺伝情報は個体発生や細胞分化の過程や(González-Aguilera et al., 2014; Wenzel et al., 2011)、環境刺激や老化によってダイナミックに変化することが知られている(Cortessis et al., 2012; Etchegaray and Mostoslavsky, 2016; Turner, 2009)。すなわち、個体は細胞内外の環境変化に対してエピジェネティクスの制御機構を介して遺伝子発現を調節することで、恒常性を維持していると考えられる(Figure 1)。

近年の研究によって、遺伝的な操作により個体全身のエピジェネティクスを変化させると、ストレス耐性や老化に影響を与えることが報告されてきている。例として、線虫やショウジョウバエにおいてヒストン H3K27 修飾因子が個体の酸化ストレス耐性や寿命を制御することが報告される他(Jin et al., 2011; Siebold et al., 2010)、マウスにおけるヒストン脱アセチル化酵素のサーチュインファミリーの因子が抗老化作用を示すなど(Herranz et al., 2010; Kanfi et al., 2012; Someya et al., 2010)が挙げられ

る。これらの報告から、エピジェネティック修飾因子が酸化ストレス耐性を含む個体の恒常性維持に関与していることが示唆される。さらに近年、個体全身のストレス応答には複数の組織の連携が重要であることが示されていることから(Van Oosten-Hawle et al., 2013; Tatum et al., 2015)、エピジェネティック修飾因子によるストレス耐性制御においても、組織間の相互作用が重要であることが考えられるが、そうした組織間ネットワークの詳細なメカニズムについては明らかでない。

また、近年の研究によって、親世代における遺伝子操作や環境変化により生じたエピジェネティックな変化が、子世代以降へと継承されることが報告されつつある(Dias and Ressler, 2014; Greer et al., 2010; Kishimoto et al., 2017; Vaiserman et al., 2017)。例として、マウスの親世代において特定の匂いを恐れるように訓練させると、精子におけるエピジェネティック変化を介して学習情報が子世代へと継承されることを示した報告や(Dias and Ressler, 2014)、線虫の発生過程において低用量ストレスに曝露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世代へと継承されることを示す報告(Kishimoto et al., 2017)が挙げられる。また、近年の研究により、siRNAなどの small non-coding RNA が環境刺激に対する応答とエピジェネティック情報の次世代への継承に関与することが報告されつつある(Posner et al., 2019; Rechavi et al., 2014)。こうした研究結果から、親世代で獲得した形質の次世代への継承において、small RNA を含むエピジェネティクス制御機構が重要であることが示唆されるが、親世代で生じたエピジェネティック変化の子世代への継承において、各組織がどのように連携しているのかについてはまだ明らかになっていない部分が多い。

本研究では、線虫のヒストン修飾因子による個体の酸化ストレス耐性制御において、腸組織から生殖腺へとエピジェネティック情報を伝達する機構が存在し、その組織間コミュニケーションが個体の酸化ストレス耐性を上昇させることを見出した。さらに、親世代における生殖腺のエピジェネティック変化を介して、酸化ストレス耐性

上昇の効果が子世代へと継承されることが明らかになった。

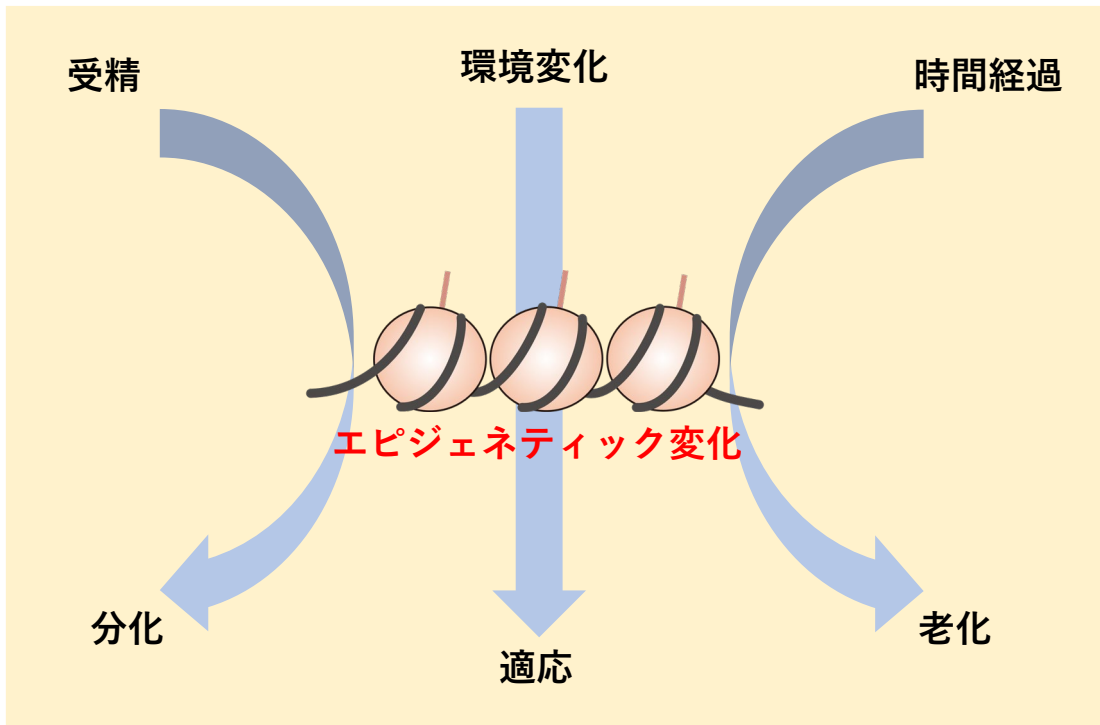


Figure 1 エピジェネティクスは様々な生命現象に関与する

エピジェネティックな遺伝情報は、個体発生および細胞分化の過程や、環境刺激や老化によってダイナミックに変化することが知られており、個体の恒常性維持に大きく関与すると考えられている。

結果

2-1 エピジェネティック情報を伝達する腸-生殖腺の組織間コミュニケーションが個体の酸化ストレス耐性を制御する

2-1-1 腸組織と生殖腺における *ash-2* の欠損により個体の酸化ストレス耐性が上昇する

はじめに、線虫におけるエピジェネティック制御因子が個体の酸化ストレス耐性制御に関与するかについて調べた。線虫のヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素などのヒストン修飾因子の遺伝子について、卵から YA までの 3 日間全身でノックダウンを行い、YA の個体の酸化ストレス耐性を測定した。酸化ストレス源として、3 mM の過酸化水素 (H_2O_2) を用いた。その結果、*ash-2* を全身でノックダウンした時に、最も大きく酸化ストレス耐性が上昇することが分かった (Figures 2A, B)。ASH-2 はヒストン H3K4 トリメチル化修飾酵素複合体の構成因子の一つとして知られている (Li and Kelly, 2011; Xu and Kim, 2011)。また、*ash-2* 変異体においても酸化ストレス耐性が有意に上昇することが分かった (Figure 2C)。次に、*ash-2* ノックダウンによる酸化ストレス耐性の上昇がヒストン H3K4 メチル化状態の変化によるものだとすれば、ヒストン H3K4 脱メチル化酵素である *rbr-2* をノックダウンすると、*ash-2* のノックダウンによる酸化ストレス耐性上昇が抑制されるのではないかと考えた。そこで、全身で *ash-2* と *rbr-2* をダブルノックダウンして酸化ストレスを測定したところ、*ash-2* ノックダウンによる酸化ストレス耐性の上昇が *rbr-2* のノックダウンによって完全に抑制されることが分かった (Figure 2D)。これらの結果から、ASH-2 と RBR-2 によって制御されるヒストン H3K4me3 のメチル化レベルの状態が、個体の酸化ストレス耐性の制御に関与することが明らかになった。

次に、個体のどの組織で *ash-2* を欠損することが、個体全身の酸化ストレス耐性の上昇に重要であるかを検討することにした。そこで、線虫の特定の組織で目的の遺伝子をノックダウンすることができる変異体(Espelt et al., 2005; Qadota et al., 2007)を用いて、組織特異的な *ash-2* のノックダウンを行い酸化ストレス耐性を調べた。その結果、生殖腺と腸組織で *ash-2* をノックダウンした時に個体の酸化ストレス耐性が大きく上昇することが明らかになった(Figure 2E, F)。そして、皮下組織でのノックダウンでも有意に酸化ストレス耐性の上昇が見られ(Figure 2G)、一方で筋肉や神経でのノックダウンでは酸化ストレス耐性に影響は見られなかった(Figure 2H, I)。さらに、生殖腺と腸組織での *ash-2* ノックダウンによる酸化ストレス耐性の上昇は、同一組織で同時に *rbr-2* をノックダウンすることで完全に抑制されることが分かった(Figure 2E, F)。以上の結果から、生殖腺と腸組織における *ash-2* の欠損が、個体の酸化ストレス耐性上昇に重要であることが明らかになった。

2-1-2 腸組織の *ash-2* の欠損による個体の酸化ストレス耐性上昇に生殖腺の RBR-2 が必要である

先行研究において、生殖腺特異的に遺伝子をノックダウンすることができる *rrf-1* 変異体は、RNAi の効果が腸組織や皮下組織にも漏れていることが報告されていたため(Kumsta and Hansen, 2012)、これらの組織で *ash-2* がノックダウンされたことにより酸化ストレス耐性が上昇している可能性を排除する必要があると考えた。そこで、腸組織で *rbr-2* をノックアウトした *rrf-1* 変異体に対して *ash-2* をノックダウンし(Figure 3A)、酸化ストレスを測定することにした。腸組織で *rbr-2* をノックダウンすると腸組織での *ash-2* ノックダウンによる酸化ストレス耐性の上昇を抑制したので(Figure 2F)、*rrf-1* 変異体の腸組織で *rbr-2* をノックアウトすることで、腸組織での *ash-2* のノックダウンによる酸化ストレス耐性上昇を打ち消すことができると考え

た。その結果、腸組織で *rbr-2* をノックアウトした *rrf-1* 変異体に *ash-2* をノックダウンすると酸化ストレス耐性が上昇することが分かった(Figures 3B, C)。また、体細胞組織で *rbr-2* をノックアウトした線虫に、全身で *ash-2* をノックダウンしても酸化ストレス耐性が上昇することが分かった(Figures 3D, E)。以上の結果から、生殖腺で *ash-2* を欠損すると個体の酸化ストレス耐性が上昇し、生殖腺と腸組織における ASH-2/RBR-2 によるヒストン H3K4 メチル化の制御が、個体の酸化ストレス耐性の制御に重要であることが示唆された。

腸組織と生殖腺の 2 つの組織でそれぞれ *ash-2* を欠損すると、酸化ストレス耐性が上昇したことから、次に、腸組織と生殖腺の両方の組織で *ash-2* を欠損した線虫の酸化ストレス耐性を調べることにした。そこで、腸組織で *ash-2* をノックアウトした *rrf-1* 変異体に対して *ash-2* をノックダウンし(Figures 3A, 4A)、酸化ストレス耐性を測定した。その結果、腸組織と生殖腺それぞれ単独で *ash-2* を欠損した線虫と比べて、両組織で *ash-2* を欠損した線虫において更なる酸化ストレス耐性の上昇は見られなかった(Figure 4B)。この結果から、腸組織と生殖腺でそれぞれ *ash-2* を欠損した時の酸化ストレス耐性の上昇は、共通のメカニズムを介している可能性が示唆された。

また、生殖腺、腸組織で *ash-2* を欠損した時の酸化ストレス耐性の上昇に、同一組織の *rbr-2* が必要であったことから(Figure 2E, F)、次に、腸組織で *ash-2* を欠損した際の酸化ストレス耐性上昇に生殖腺の *rbr-2* が必要であるか、またその逆に生殖腺で *ash-2* を欠損した際の酸化ストレス耐性上昇に腸組織の *rbr-2* が必要であるかを検討することにした。その結果、腸組織での *ash-2* ノックアウトによる酸化ストレス耐性の上昇が、生殖腺での *rbr-2* ノックダウンによって抑制されることが明らかになった(Figure 4C)。一方で、生殖腺で *ash-2* をノックダウンした線虫の腸組織で *rbr-2* をノックアウトしても、酸化ストレス耐性は上昇したままだった(Figure 3C)。上述したように、生殖腺特異的ノックダウンの変異体として用いられる *rrf-1* 変異体は腸組織でも

ノックダウンが働く可能性があるため、生殖腺に加えて腸組織でも *rbr-2* がノックダウンされたことにより、腸組織での *ash-2* ノックアウトによる酸化ストレス耐性の上昇が抑制された可能性がある。この問題を検討するために、*rbr-2* 変異体を用いて更なる実験を行うことにした。まず始めに、*rbr-2* 変異体の腸組織で *ash-2* をノックアウトして酸化ストレス耐性を測定した結果、酸化ストレス耐性は上昇しなかった(Figures 4D, F)。次に、腸組織で *ash-2* をノックアウトした *rbr-2* 変異体に対して体細胞組織で *rbr-2* をレスキューした。仮に、酸化ストレス耐性上昇の抑制が腸組織での *rbr-2* の欠損によるものであれば、腸組織で *rbr-2* をレスキューすると酸化ストレス耐性は再び上昇すると考えられる。しかし、腸組織で *ash-2* をノックアウトした *rbr-2* 変異体の体細胞組織で *rbr-2* をレスキューしても、酸化ストレス耐性の上昇は見られなかったことから(Figures 4E, F)、腸組織での *ash-2* ノックアウトによる酸化ストレス耐性の上昇に生殖腺の RBR-2 が必要であることが分かった。以上の結果から、腸組織での *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性の上昇には、少なくとも一部は生殖腺におけるエピジェネティックな変化が関与しており、このことから腸組織から生殖腺へとエピジェネティック情報を伝達する組織間コミュニケーションが存在する可能性が示唆された。

2-1-3 腸組織の *ash-2* の欠損により生殖腺のヒストン H3K4 トリメチル化レベルが減少する

エピジェネティック情報を伝達する腸-生殖腺の組織間コミュニケーションの存在が示唆されたため、次に、腸での *ash-2* ノックダウンが生殖腺の卵の H3K4 トリメチル化レベルに影響を与えるかについて検討することにした。まず始めに、全身で *ash-2* をノックダウンすると、胚において H3K4 トリメチル化レベルが減少することを確認した(Figures 5A, B)。さらに、腸組織で *ash-2* をノックダウンすると、胚における

H3K4 トリメチル化レベルが、程度は小さいが有意に減少することが分かった (Figures 5A, B)。また、腸組織特異的な *ash-2* のノックダウンが卵に漏れている可能性を検討するために、卵における *ash-2* の mRNA レベルを qRT-PCR を用いて解析したが、腸組織で *ash-2* をノックダウンした線虫の卵における *ash-2* の mRNA レベルに変化は見られなかった (Figure 5C)。これらの結果から、腸組織における *ash-2* の欠損が、生殖腺におけるエピジェネティックな変化を誘導することが明らかになり (Figure 5D)、この腸-生殖腺の組織間コミュニケーションが個体の酸化ストレス耐性の制御に重要であることが示された。

線虫におけるヒストン H3K4 脱メチル化酵素は、RBR-2 に加えて SPR-5、LSD-1、AMX-1 の 3 種類が知られている。RBR-2 はヒストン H3K4 トリメチル化を、SPR-5、LSD-1、AMX-1 はヒストン H3K4 モノ・ジメチル化を効率よく除去することが知られている (Alvares et al., 2014)。そこで、腸組織での *ash-2* ノックアウトによる酸化ストレス耐性上昇における SPR-5、LSD-1、AMX-1 の関与を検討することにした。その結果、生殖腺で *spr-5* をノックダウンすると、腸組織での *ash-2* ノックアウトによる酸化ストレス耐性の上昇が抑制されることが分かった (Figure 6A)。一方、*amx-1* や *lsd-1* を生殖腺でノックダウンしても酸化ストレス耐性上昇の抑制は見られなかった (Figures 6B, C)。先行研究において、RBR-2 と SPR-5 は同一経路で機能するという報告があることから (Alvares et al., 2014)、酸化ストレス耐性制御においても生殖腺の RBR-2 と SPR-5 が同一の経路で働く可能性が示唆された。

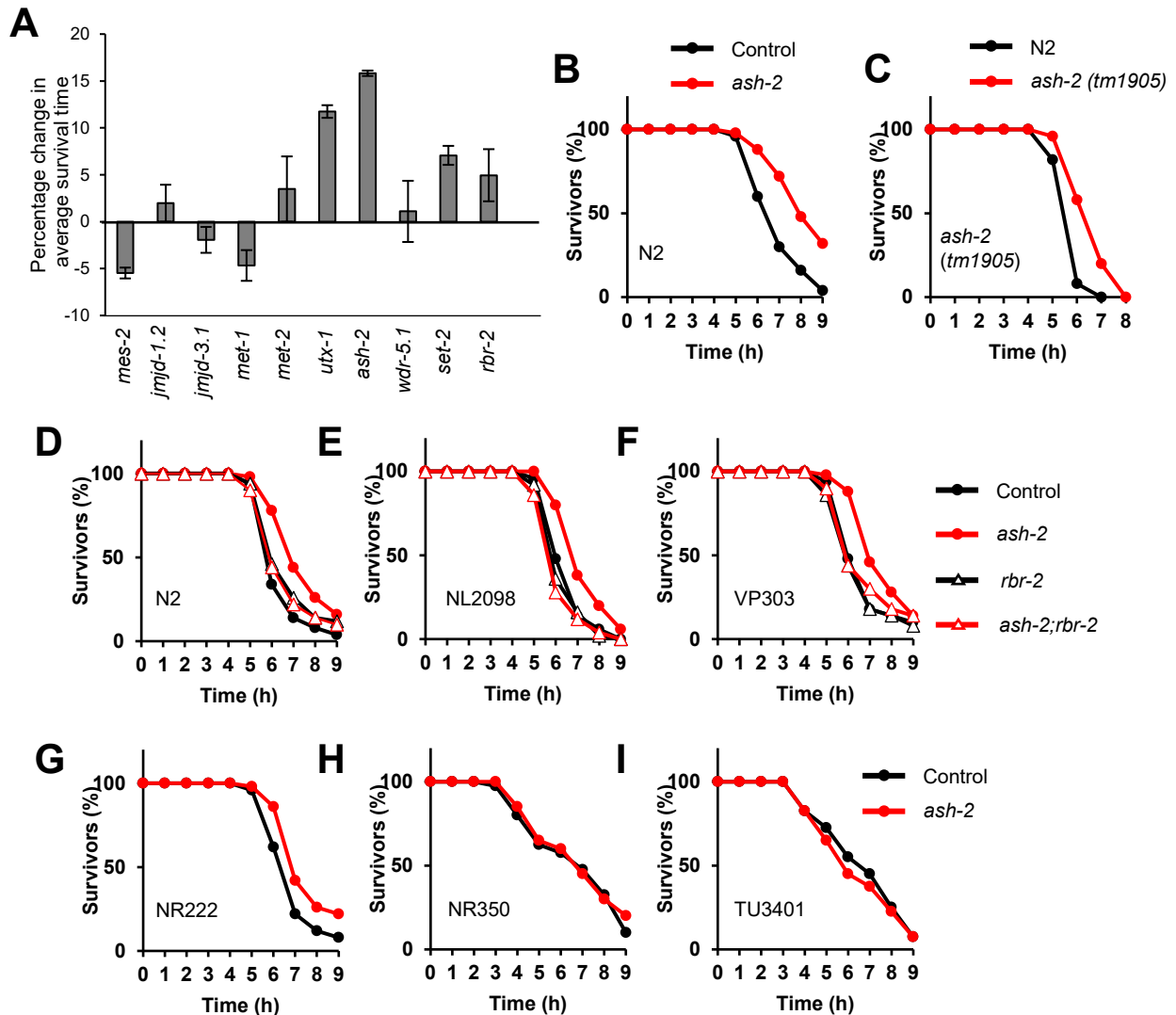


Figure 2 腸組織と生殖腺における*ash-2*の欠損により個体の酸化ストレス耐性が上昇する

(A) 各ヒストン修飾因子をノックダウンした線虫の酸化ストレス(3 mM H₂O₂) 耐性を、コントロールRNAiの線虫の酸化ストレス耐性と比較した変化率。2回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

(B) *ash-2*を全身(N2)でノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。

(C) *ash-2*変異体(*tm1905*)の酸化ストレス耐性。実験は2回行っており、代表的なデータを示す。

(D-F) 全身(D)、生殖腺(E)、腸組織(F)で*ash-2*と*rbr-2*をダブルノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性。NL2098とVP303はそれぞれ生殖腺と腸組織において特異的なノックダウンが可能な系統である。実験は2回行っており、代表的なデータを示す。

(G-I) 組織特異的に*ash-2*をノックダウンした際の酸化ストレス耐性。NR222、NR350、TU3401はそれぞれ皮下組織(G)、筋肉(H)、神経(I)において特異的なノックダウンが可能な系統である。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。

各実験におけるP値などの詳細なデータはTable 1, 2, 3に示す。

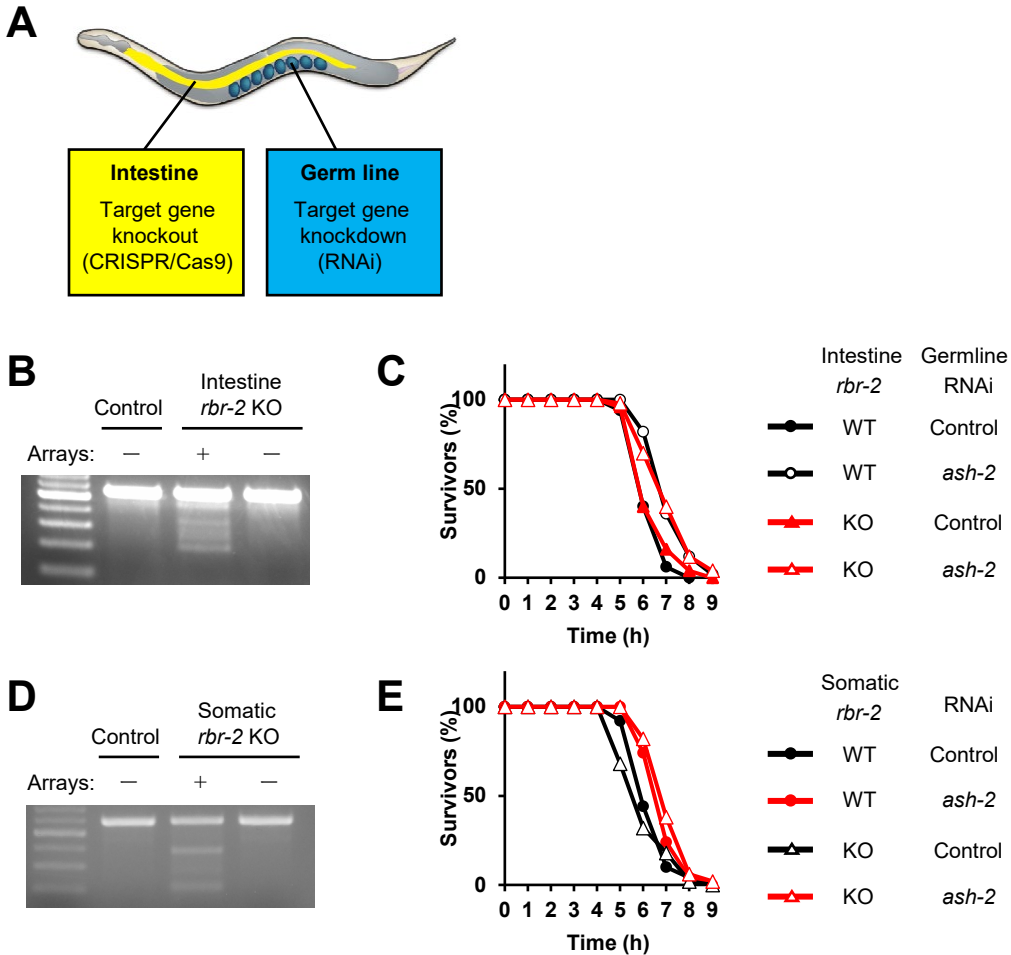


Figure 3 生殖腺の*ash-2*の欠損による酸化ストレス耐性上昇の更なる検討

(A) 生殖腺と腸組織の両組織で遺伝子を操作する方法を示した図。生殖腺特異的にノックダウンできる変異体(NL2098(*rff-1*))に対して、CRISPR-Cas9を用いて腸組織特異的なノックアウトを行う。

(B) CRISPR-Cas9を用いた腸組織特異的な*rbr-2*ノックアウトによる変異導入を確認したT7E1アッセイの結果(左から右: NL2098、腸組織で*rbr-2*をノックアウトしたNL2098、No arrayのNL2098)。

(C) 腸組織で*rbr-2*をノックアウトした線虫に対して生殖腺で*ash-2*をノックダウンした際の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。

(D) CRISPR-Cas9を用いた体細胞組織特異的な*rbr-2*ノックアウトによる変異導入を確認したT7E1アッセイの結果(左から右: N2、体細胞組織で*rbr-2*をノックアウトしたN2、No arrayのN2)。

(E) 体細胞組織で*rbr-2*をノックアウトした線虫に対して全身で*ash-2*をノックダウンした際の酸化ストレス耐性。実験は2回行っており、代表的なデータを示す。

各実験における*P*値などの詳細なデータはTable 4に示す。

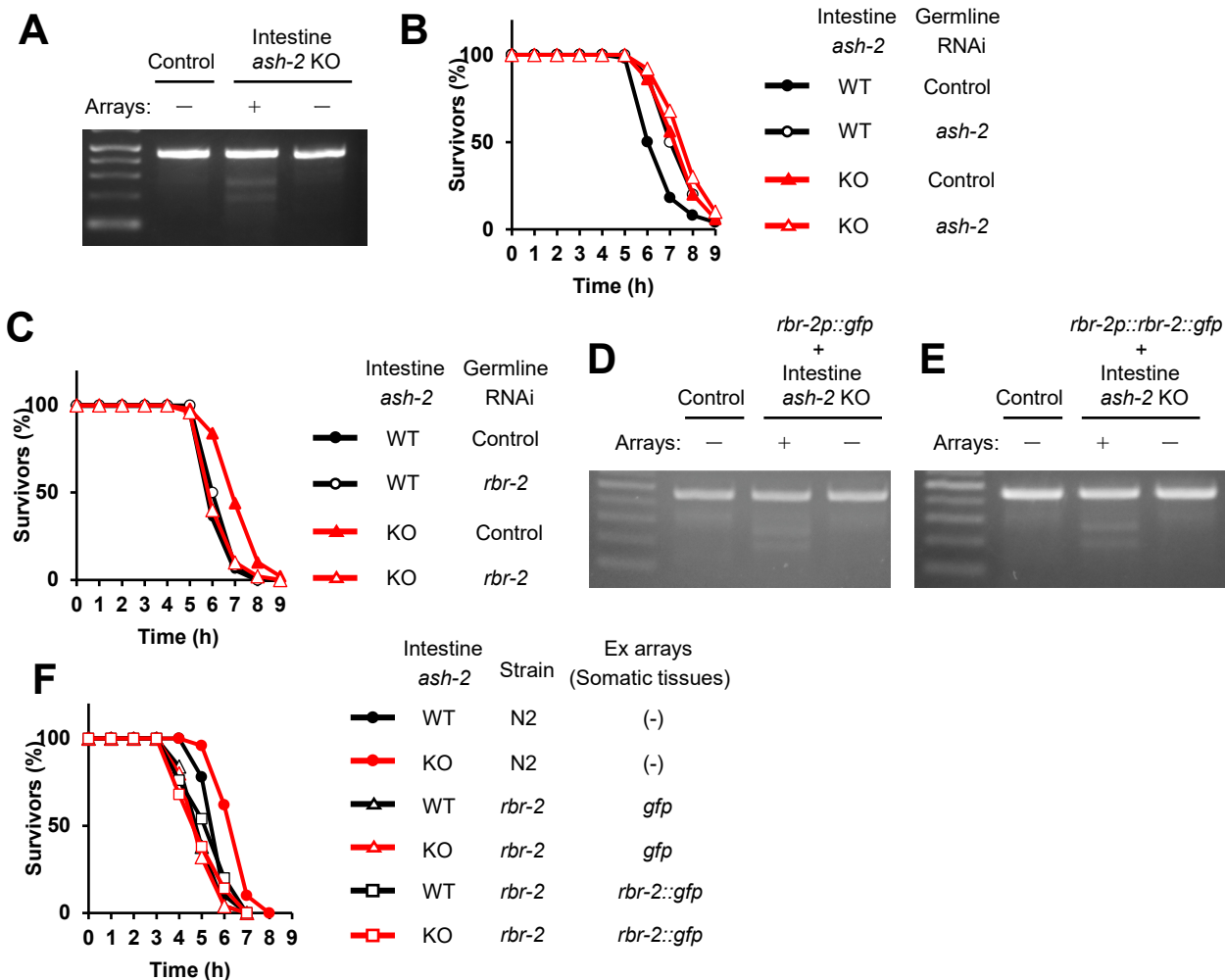


Figure 4 腸組織の*ash-2*の欠損による個体の酸化ストレス耐性上昇に生殖腺のRBR-2が必要である

(A) CRISPR-Cas9を用いた腸組織特異的な*ash-2*ノックアウトによる変異導入を確認したT7E1アッセイの結果(左から右: NL2098、腸組織で*ash-2*をノックアウトしたNL2098、No arrayのNL2098)。

(B) 腸組織で*ash-2*をノックアウトした線虫に対して生殖腺で*ash-2*をノックダウンした際の酸化ストレス耐性。実験は2回行っており、代表的なデータを示す。

(C) 腸組織で*ash-2*をノックアウトした線虫に対して生殖腺で*rbr-2*をノックダウンした際の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。

(D, E) CRISPR-Cas9を用いた腸組織特異的な*ash-2*ノックアウトによる変異導入を確認したT7E1アッセイの結果(D)左から右: *rbr-2(tm1231)*、*rbr-2*プロモーター下で*gfp*を発現させ、腸組織で*ash-2*をノックアウトした*rbr-2(tm1231)*とNo arrayの*rbr-2(tm1231)*、(E)左から右: *rbr-2(tm1231)*、*rbr-2*プロモーター下で*rbr-2::gfp*を発現させ、腸組織で*ash-2*をノックアウトした*rbr-2(tm1231)*とNo arrayの*rbr-2(tm1231)*。

(F) 体細胞組織で*rbr-2*をレスキューした*rbr-2*変異体(*tm1231*)に対して腸組織で*ash-2*をノックアウトした際の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。各実験における*P*値などの詳細なデータはTable 5, 6, 7に示す。

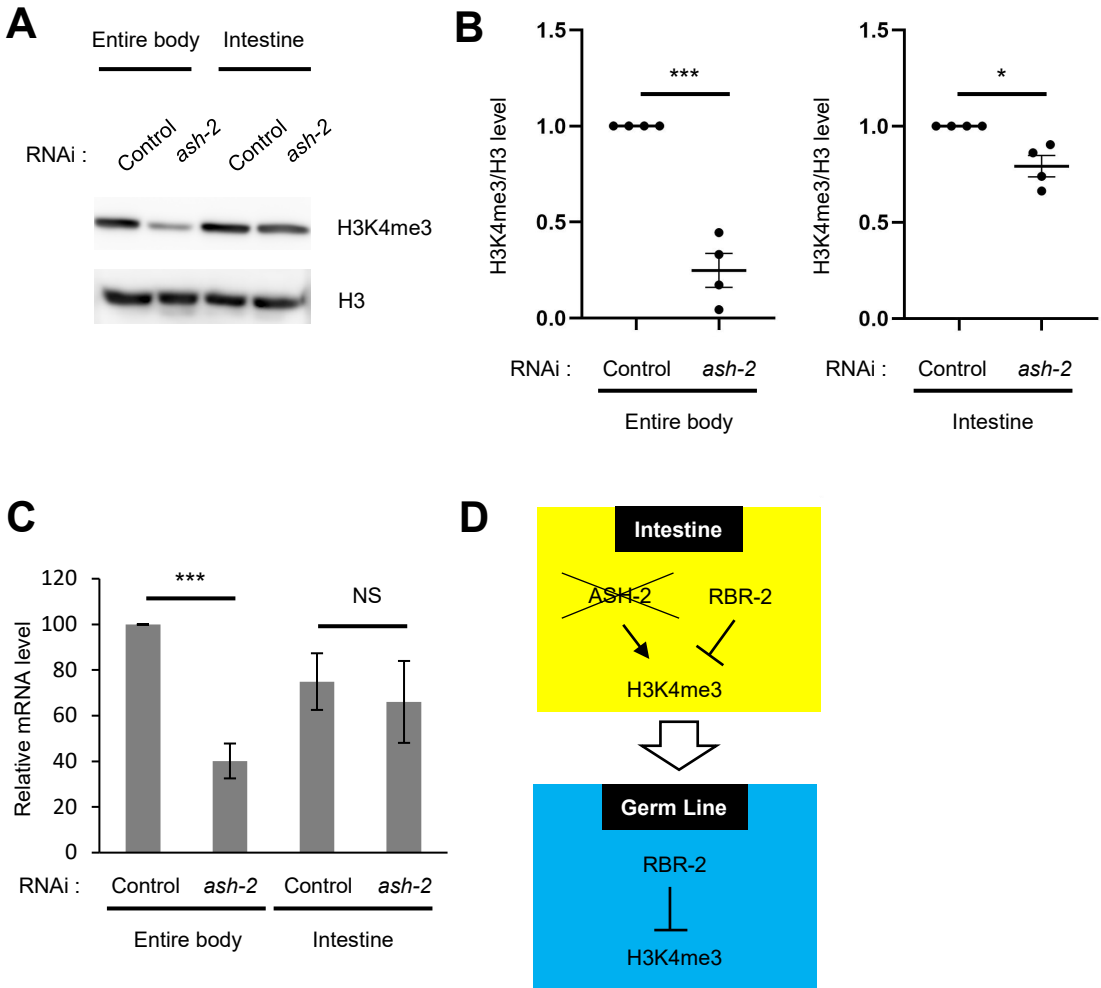


Figure 5 腸組織の*ash-2*の欠損により生殖腺のヒストンH3K4トリメチル化レベルが減少する

(A, B) 全身(左2列)と腸組織(右2列)で*ash-2*をノックダウンした線虫の卵におけるヒストンH3K4me3レベルを示すウエスタンブロット(A)、およびその定量結果(B)。ウエスタンブロットは4回行っており、代表的なデータを示す。H3K4me3レベルはヒストンH3レベルをもとにノーマライズした。4回の実験の平均値(±標準誤差)を示す。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.005$ 。P値はStudent's t-testにより算出した。

(C) 全身(左2列)と腸組織(右2列)で*ash-2*をノックダウンした線虫の卵における*ash-2*のmRNA発現量。実験は5回行っており、5回の実験の平均値(±標準誤差)を示す。*** $P < 0.005$ 。P値はStudent's t-testにより算出した。

(D) 腸-生殖腺間におけるエピジェネティック情報の伝達のモデル図。

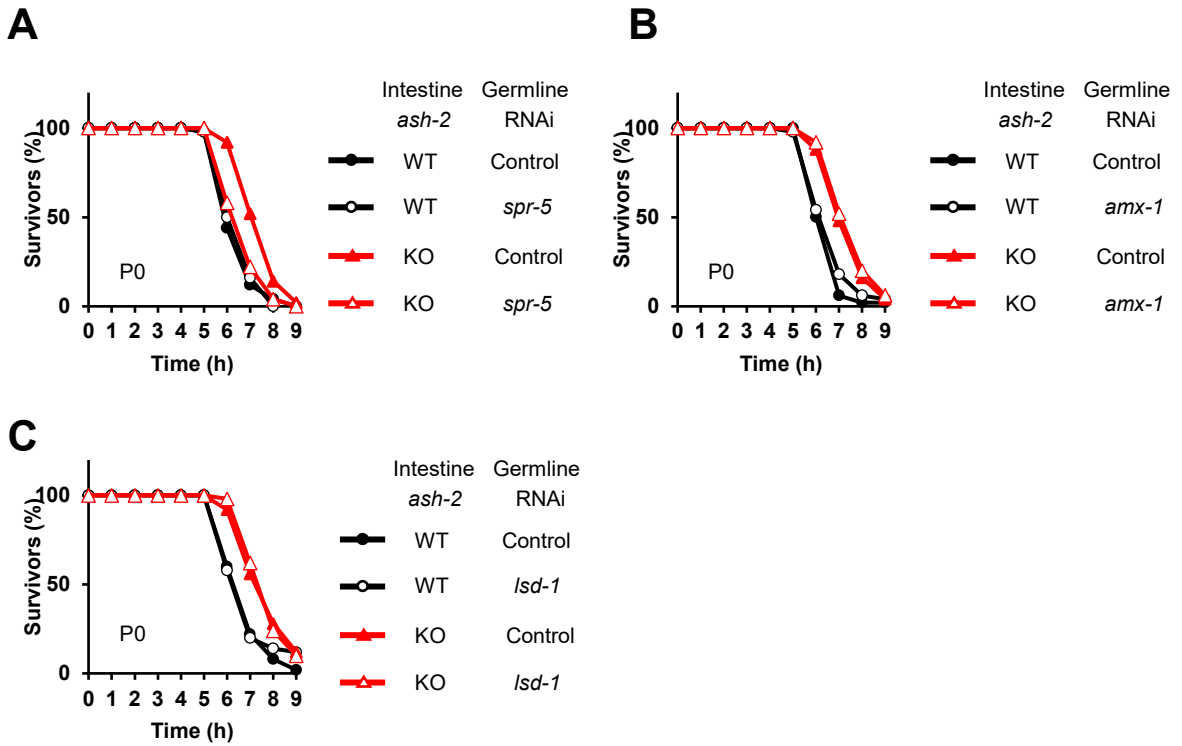


Figure 6 腸組織での*ash-2*のノックアウトによる酸化ストレス耐性上昇に生殖腺の*SPR-5*が必要である

(A-C) 腸組織で*ash-2*をノックアウトした線虫に対して生殖腺で*spr-5* (A)、*amx-1* (B)、*lsd-1* (C)をノックダウンした際の酸化ストレス耐性。実験は2回行っており、代表的なデータを示す。

各実験における*P*値などの詳細なデータはTable 6に示す。

2-2 親世代の線虫の腸組織の *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性上昇が次世代へと継承される

2-2-1 腸組織における *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性の上昇が次世代へと継承される

これまでの結果から、腸組織で *ash-2* を欠損すると H3K4 脱メチル化酵素である RBR-2 と SPR-5 の機能により生殖腺のエピジェネティクスが変化することが示唆された。近年の研究によって、生殖腺における様々なヒストン修飾因子が親世代で獲得した形質の次世代への継承に重要な役割を果たすことが報告されてきている (Greer et al., 2011; Kishimoto et al., 2017; Klosin et al., 2017)。そこで次に、親世代の腸組織の *ash-2* の欠損により誘導される生殖腺のエピジェネティック変化が、次世代の個体の酸化ストレス耐性に与える影響について検討した。腸特異的に遺伝子をノックダウンできる変異体 (VP303) は、生殖腺では RNAi が働かないため、ノックダウンの効果は次世代へ継承されないと考えられる。そこで、腸組織で *ash-2* をノックダウンした個体から生まれた F1、F2 世代の酸化ストレス耐性を測定した。その結果、親世代の腸組織で *ash-2* をノックダウンすると、その子世代において酸化ストレス耐性が上昇することが明らかになった (Figure 7A)。さらに、子世代に次いで孫世代以降の酸化ストレス耐性について検討したところ、F2 世代においても酸化ストレス耐性が上昇することを見出した (Figure 7A)。しかし、F3 世代では酸化ストレス耐性の上昇が見られなかった (Figure 7A)。また、他の組織 (皮下組織、筋肉、神経) で *ash-2* をノックダウンした個体から生まれた子世代の酸化ストレス耐性を測定したところ、F1 世代における酸化ストレス耐性はコントロール群と同程度であった (Figure 7B)。これらの結果から、腸組織で *ash-2* をノックダウンすると、生殖腺のエピジェネティック変化を介して酸化ストレス耐性上昇が次世代へと継承されることが示唆された。この結果をさらに裏付けるために、腸組織特異的な *ash-2* のノックアウト実験を行うことにした。線

虫では、マイクロインジェクションされた DNA は染色体外 DNA アレイという巨大な直鎖状 DNA を形成するが(Mello et al., 1991)、染色体外 DNA アレイは細胞分裂ごとにランダムに失われるため(Kadandale et al., 2009)、腸組織特異的に *ash-2* をノックアウトしたトランスジェニック線虫からは、染色体外 DNA アレイを持ったノックアウト個体と、染色体外 DNA アレイを持たない野生型の 2 種類が産まれてくると考えられる(Figure 7C)。そこでまず、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集の変異導入の確認に用いられる T7E1 アッセイを行い、腸組織で *ash-2* をノックアウトした親世代の線虫から産まれてきた子世代において、親世代と同様にノックアウトされた線虫と、野生型の線虫の 2 種類が産まれてくることを確かめた(Figure 7D)。次に、腸組織で *ash-2* をノックアウトした親世代の線虫および野生型の F1 世代以降の酸化ストレス耐性を測定した。その結果、まずは腸組織で *ash-2* をノックアウトした親世代の線虫において酸化ストレス耐性の上昇が見られた(Figure 7F)。さらに、野生型の F1、F2 世代においても酸化ストレス耐性の上昇が見られることが分かった(Figure 7F)。そして F3 世代では、酸化ストレス耐性の上昇は見られなかった(Figure 7F)。また、体細胞組織特異的に *ash-2* をノックアウトした線虫を用いて同様の実験を行ったところ、腸組織で *ash-2* をノックアウトした時と同様に、野生型の F1、F2 世代において酸化ストレス耐性の上昇が見られることが分かった(Figures 7E, G)。ここまでの結果から、親世代における腸・生殖腺の組織間コミュニケーションによって、酸化ストレス耐性上昇の効果が孫世代まで継承されることが示された。

2-2-2 腸組織の *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性の上昇は small RNA 経路を含むエピジェネティクスの制御機構を介して次世代へと継承される

酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承のメカニズムを検討するにあたって、生殖腺におけるエピジェネティックな変化を介して次世代へと継承される可能性と、母親

から核とともに受け継ぐ細胞質成分（タンパク質や mRNA など）の影響、つまり母性効果により継承される可能性が考えられた。上述の酸化ストレス耐性上昇の継承は、親世代の雌雄同体から自家受精によって産まれた子孫の表現型について観察しているため、腸組織で *ash-2* をノックアウトした母体からの影響がどの程度含まれているのかは明らかではなかった。そこで母性効果を排除するため、親世代のオスの腸組織で *ash-2* をノックアウトし、野生型の雌雄同体と交配させたのち、その子世代のストレス耐性を測定した(Figure 8A)。ここでは、オス親に GFP 発現体(*unc-119p::gfp*) を用いることによって、交配により産まれる線虫を GFP の蛍光で選別し、雌雄同体の自家受精から産まれる線虫との区別を行った。その結果、驚くべきことに、この子世代の線虫ではコントロール群よりも有意に酸化ストレス耐性が上昇することが分かった(Figure 8B)。この結果から、酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承は、母性効果によるものではなく、腸組織で *ash-2* を欠損することによって親世代の生殖腺で何らかのエピジェネティックな変化が誘導され、その変化が世代を越えて維持され子世代以降の酸化ストレス耐性上昇に寄与している可能性が示唆された。

近年の研究によって、siRNA を含む small non-coding RNA が、親世代で生じたエピジェネティック変化の次世代への継承に関与することが報告されている(Posner et al., 2019; Rechavi et al., 2014)。そこで次に、酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承に small RNA の機構が関与するかを検討することにした。生殖腺特異的に発現する Argonaute(AGO)タンパク質である HRDE-1 は、環境ストレスによる内在性の siRNA 量の変化を次世代に継承する役割が知られている(Ni et al., 2016; Rechavi et al., 2014)。そのため、親世代の腸組織における *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承が、*hrde-1* 依存的であるかについて検討することにした。まず始めに、*hrde-1* 変異体に対して腸組織で *ash-2* をノックアウトしたところ、野生型の腸組織で *ash-2* をノックアウトした際と同様に酸化ストレス耐性が上昇することが分かつ

た(Figures 8C, D)。次に、腸組織で *ash-2* をノックアウトした *hrde-1* 変異体の F1 世代以降の酸化ストレス耐性を測定した。Figure 7D と同様に、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集の変異導入の確認に用いられる T7E1 アッセイを行い、腸組織で *ash-2* をノックアウトした親世代の *hrde-1* 変異体から産まれてきた子世代において、親世代と同様にノックアウトされた線虫と、ノックアウトされていない線虫の 2 種類が産まれてくることを確かめた(Figure 8C)。そして、腸組織で *ash-2* をノックアウトした野生型において見られた F1、F2 世代での酸化ストレス耐性上昇が、*hrde-1* 変異体においては見られなくなることが分かった(Figure 8D)。ここまでの結果から、腸組織の *ash-2* ノックアウトによる酸化ストレス耐性上昇が、small RNA 経路を含むエピジェネティクスの制御機構によって次世代へと継承されることが明らかになった。

2-2-3 腸組織の *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性上昇の子世代への継承に親世代および子世代の生殖腺における RBR-2 と SPR-5 が必要である

腸組織の *ash-2* ノックアウトによる酸化ストレス耐性上昇には、生殖腺の RBR-2 および SPR-5 が必要であったことから、生殖腺の RBR-2 と SPR-5 によるエピジェネティック変化を介して酸化ストレス耐性上昇が次世代へと継承されるのではないかと考えた。この可能性を検討するために、腸組織で *ash-2* をノックアウトした線虫の生殖腺で *rbr-2* と *spr-5* をノックダウンして、そこから産まれてくる子世代の線虫の酸化ストレス耐性を測定した。腸組織で *ash-2* をノックアウトした線虫の生殖腺で *rbr-2* と *spr-5* をノックダウンすると酸化ストレス耐性上昇は抑制されるが(Figures 4C, 6A)、この線虫から産まれてきた子世代においても酸化ストレス耐性の上昇が見られなくなることが分かった(Figures 9A, B)。また、親世代の生殖腺の *amx-1* や *lsd-1* のノックダウンは、腸組織の *ash-2* ノックアウトによる酸化ストレス耐性上昇に影響を与えなかったが(Figures 6B, C)、同様に子世代の酸化ストレス耐性上昇にも影響を与え

なかった(Figures 9C, D)。次に、子世代における酸化ストレス耐性上昇において、子世代の生殖腺の RBR-2 や SPR-5 が必要であるかを検討することにした。その結果、腸組織で *ash-2* をノックアウトした線虫から産まれてきた子世代の線虫の生殖腺で *rbr-2* や *spr-5* をノックダウンすると、酸化ストレス耐性上昇が抑制されることが分かった(Figures 9E, F)。一方、子世代の線虫の腸組織で *rbr-2* をノックダウンしても、酸化ストレス耐性上昇に影響は見られなかった(Figure 9G)。以上のことから、腸組織の *ash-2* ノックアウトによる酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承において、親世代と子世代の生殖腺における RBR-2 と SPR-5 によるエピジェネティクス制御が重要であることが示された。

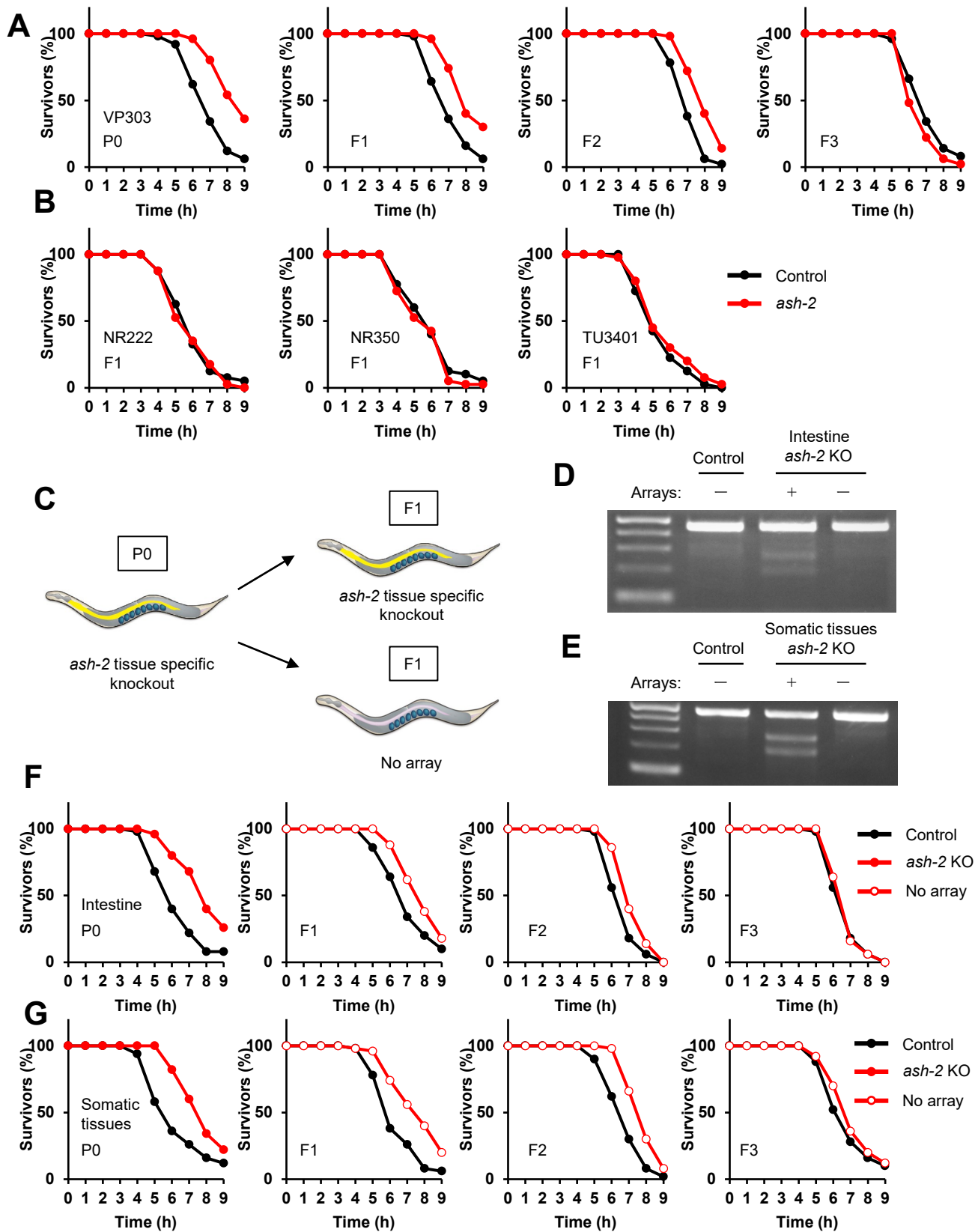


Figure 7 (Figure legendは次のページに示す)

Figure 7 腸組織における*ash-2*の欠損による酸化ストレス耐性の上昇が次世代へと継承される

- (A) 腸組織で*ash-2*をノックダウンしたP0世代からF3世代までの酸化ストレス耐性。ノックダウンは親世代のみで行っている。実験はそれぞれ3回行っており、代表的なデータを示す。
- (B) 親世代の皮下組織(左)、筋肉(中央)、神経(右)で*ash-2*をノックダウンした線虫から産まれたF1世代の酸化ストレス耐性。実験はそれぞれ3回行っており、代表的なデータを示す。
- (C) 腸組織で*ash-2*を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。
- (D, E) CRISPR-Cas9を用いた組織特異的な*ash-2*ノックアウトによる変異導入を確認したT7E1アッセイの結果(D)(左から右: N2、腸組織で*ash-2*をノックアウトしたN2、No arrayのN2)、(E)(左から右: N2、体細胞組織で*ash-2*をノックアウトしたN2、No arrayのN2)。
- (F) 腸組織で*ash-2*をノックアウトした親世代の線虫およびNo arrayの野生型のF1-F3世代の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。
- (G) 体細胞組織で*ash-2*をノックアウトした親世代の線虫およびNo arrayの野生型のF1-F3世代の酸化ストレス耐性。実験は2回行っており、代表的なデータを示す。各実験におけるP値などの詳細なデータはTable 2, 8に示す。

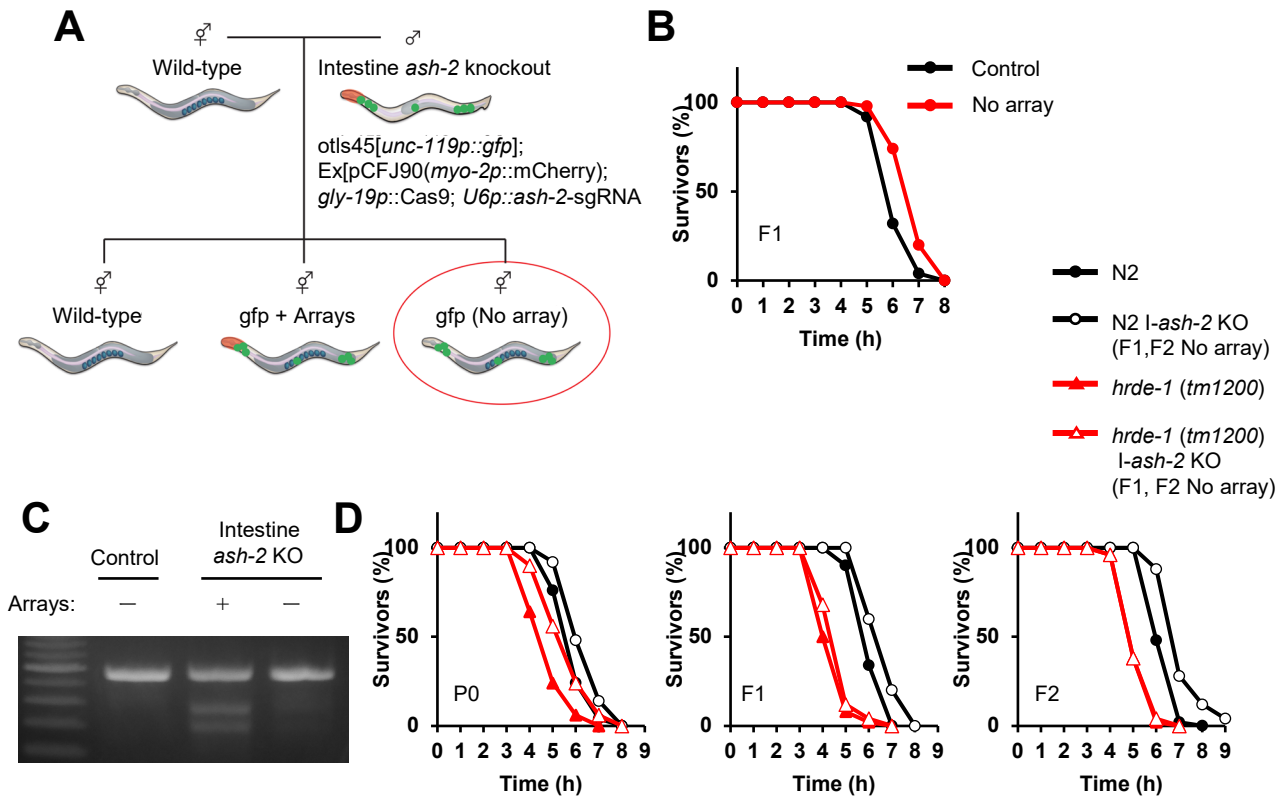


Figure 8 腸組織における*ash-2*の欠損による酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承にsmall RNA経路を含むエピジェネティクスの機構が関与する

(A) 腸組織で*ash-2*をノックアウトしたオス親から交配により野生型のF1世代を得る方法。GFPの蛍光によって、交配により産まれたF1世代と雌雄同体の自家受精によって産まれたF1世代とを区別する。

(B) 交配により産まれた野生型のF1世代の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。

(C) CRISPR-Cas9を用いた腸組織特異的な*ash-2*ノックアウトによる変異導入を確認したT7E1アッセイの結果(左から右: *hrde-1*(*tm1200*)、腸組織で*ash-2*をノックアウトした*hrde-1*(*tm1200*)、No arrayの*hrde-1*(*tm1200*))。

(D) 腸組織で*ash-2*をノックアウトした親世代の*hrde-1*(*tm1200*)およびNo arrayのF1-F2世代の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。

各実験におけるP値などの詳細なデータはTable 9, 10に示す。

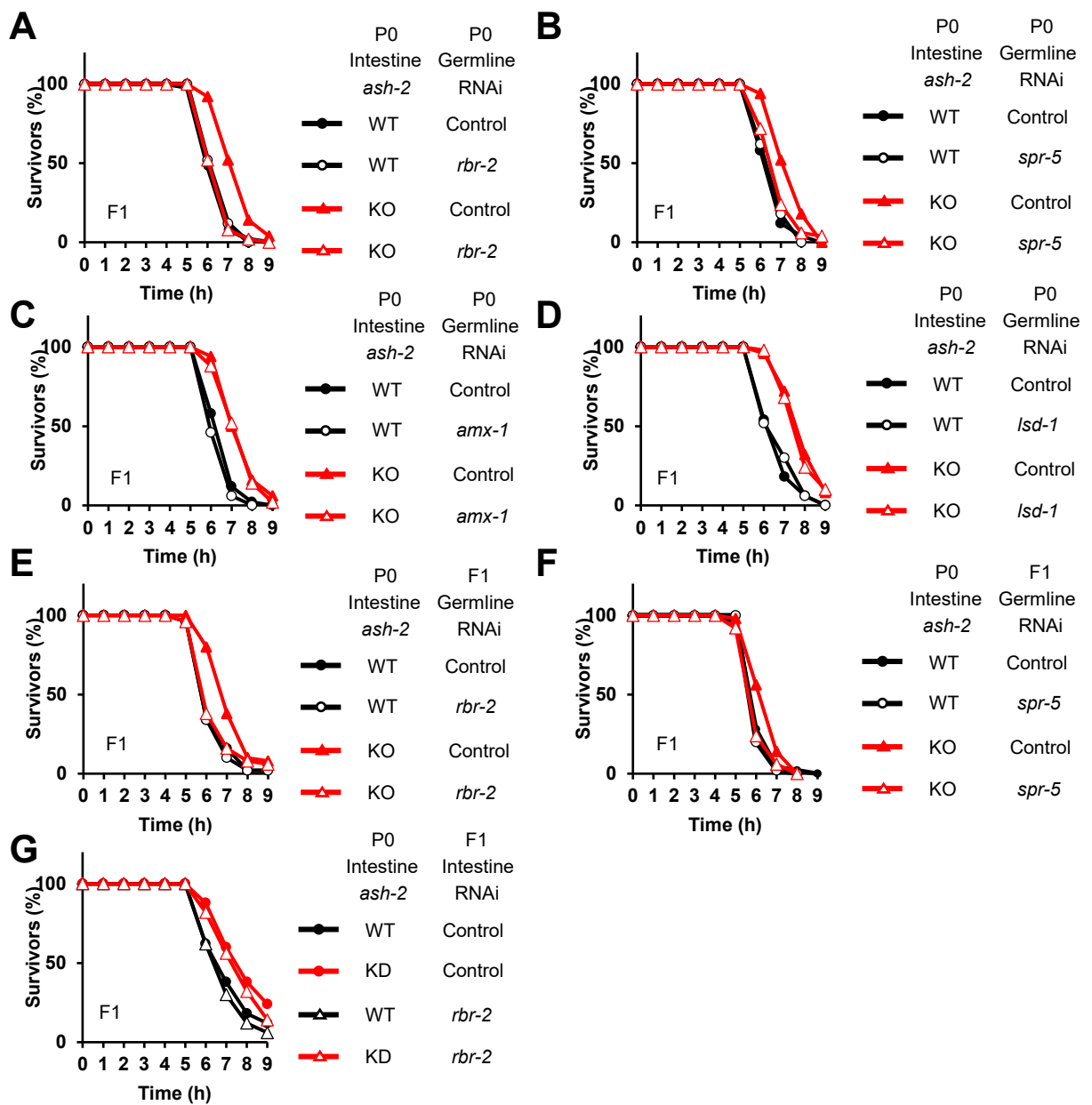


Figure 9 腸組織における*ash-2*の欠損による酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承および次世代での上昇に生殖腺のRBR-2とSPR-5が必要である

(A-D) 腸組織で*ash-2*をノックアウトした親世代の線虫の生殖腺で*rbr-2*(A)、*spr-5*(B)、*amx-1*(C)、*lsd-1*(D)をノックダウンした時の子世代の酸化ストレス耐性。実験はそれぞれ2回もしくは3回行っており、代表的なデータを示す。

(E, F) 腸組織で*ash-2*をノックアウトした親世代の線虫から生まれた子世代の線虫の生殖腺で*rbr-2*(E)、*spr-5*(F)をノックダウンした時の子世代の酸化ストレス耐性。実験はそれぞれ2回行っており、代表的なデータを示す。

(G) 腸組織で*ash-2*をノックダウンした親世代の線虫から生まれた子世代の線虫の腸組織で*rbr-2*をノックダウンした時の子世代の酸化ストレス耐性。実験はそれぞれ2回行っており、代表的なデータを示す。

各実験における*P*値などの詳細なデータはTable 6, 11, 12に示す。

2-3 *ash-2*の欠損による酸化ストレス耐性上昇および次世代への継承に腸組織の転写因子 DAF-16 が必要である

2-3-1 腸組織における *ash-2*の欠損による酸化ストレス耐性上昇に腸組織の DAF-16 が必要である

ここまでの結果から、腸組織で *ash-2*を欠損すると個体の酸化ストレス耐性が上昇し、その効果が次世代に継承されることが明らかになったので、次に、腸組織の *ash-2*の欠損による酸化ストレス耐性上昇の分子メカニズムを解析することにした。そこで、線虫においてストレス応答に重要な役割を果たすことが知られている転写因子 DAF-16 と SKN-1 の関与を検討した。DAF-16 は、insulin/IGF-like signaling pathway の最下流で働くフォークヘッド転写因子で、寿命やストレス耐性の制御因子として知られる。また、SKN-1 は NRF2 の線虫ホモログであり、酸化ストレス応答で中心的な役割を担う転写因子である。まず、これらの転写因子の変異体を用いて、全身で *ash-2*をノックダウンして酸化ストレス耐性を測定した。その結果、*daf-16*変異体では、全身の *ash-2*ノックダウンによる酸化ストレス耐性の上昇が抑制されることが分かった(Figure 10A)。一方で、*skn-1*変異体では、全身の *ash-2*ノックダウンにより個体の酸化ストレス耐性が上昇した(Figure 10B)。この結果から、*ash-2*の欠損による個体の酸化ストレス耐性上昇に、DAF-16 が必要であることが分かった。

次に、個体の酸化ストレス耐性上昇において、DAF-16 が腸組織と生殖腺のどちらで働くことが重要であるのかについて調べることにした。そこで、腸組織と生殖腺のそれぞれの組織で *ash-2*と *daf-16*のダブルノックダウンを行い、酸化ストレス耐性を測定した。その結果、腸組織で *daf-16*をノックダウンすると、*ash-2*ノックダウンによる酸化ストレス耐性の上昇が完全に抑制されることが分かった(Figure 10C)。一方、生殖腺で *daf-16*をノックダウンしても酸化ストレス耐性上昇は抑制されなかった(Figure 10D)。さらに、腸組織で *ash-2*をノックアウトした線虫の生殖腺で *daf-16*を

ノックダウンしたが、酸化ストレス耐性上昇は抑制されなかった(Figure 10E)。これらの結果から、腸組織の DAF-16 が個体の酸化ストレス耐性制御において重要であることが示された。

2-3-2 酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承および次世代での上昇に腸組織の DAF-16 が必要である

次に、腸組織の *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承に、腸組織の DAF-16 が関与するかについて検討することにした。親世代の腸組織で *ash-2* と *daf-16* をダブルノックダウンすると、酸化ストレス耐性上昇は見られないが(Figure 10C)、そこから産まれた子世代の線虫の酸化ストレス耐性を測定したところ、酸化ストレス耐性は上昇しないことが明らかになった(Figure 11A)。この結果は、腸組織から生殖腺へのエピジェネティック情報の伝達に腸組織の DAF-16 が関与することを示唆している。また、腸組織で *ash-2* をノックダウンした親世代の線虫から産まれた子世代の線虫において、腸組織で *daf-16* をノックダウンすると酸化ストレス耐性上昇が抑制されることが明らかになった(Figure 11B)。これらの結果から、腸組織の *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性上昇と次世代への継承に、腸組織の DAF-16 の機能が必要であることが示された(Figure 11C)。

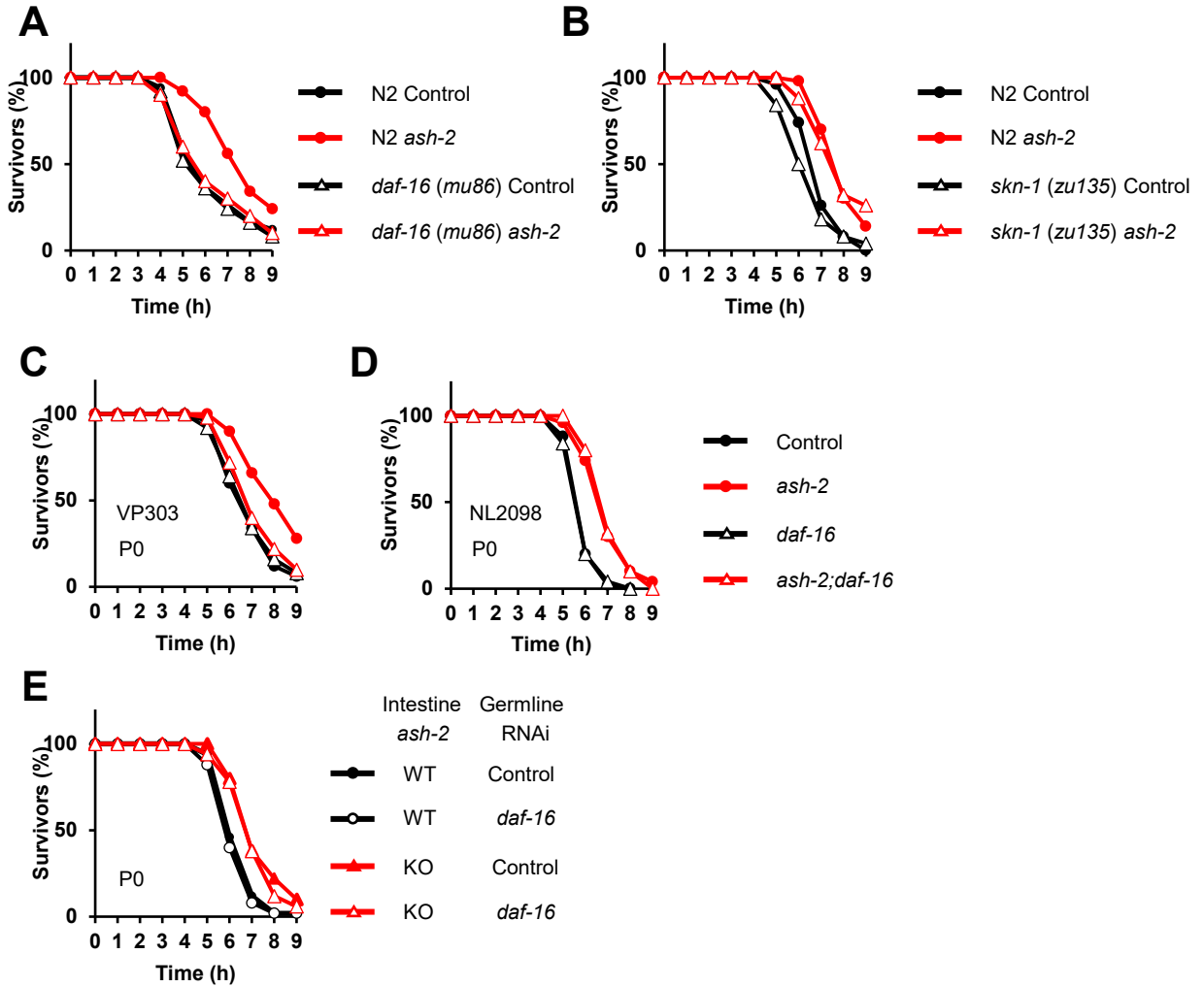


Figure 10 *ash-2*の欠損による酸化ストレス耐性上昇に腸組織の転写因子DAF-16が必要である

(A, B) N2と*daf-16*変異体(*mu86*)(A)、および*skn-1*変異体(*zu135*)(B)に対して全身で*ash-2*をノックダウンした時の酸化ストレス耐性。実験は2回以上行っており、代表的なデータを示す。

(C, D) 腸組織(C)および生殖腺(D)で*ash-2*と*daf-16*をダブルノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性。実験は3回以上行っており、代表的なデータを示す。

(E) 腸組織で*ash-2*をノックアウトした線虫の生殖腺で*daf-16*をノックダウンした時の酸化ストレス耐性。実験は2回行っており、代表的なデータを示す。

各実験におけるP値などの詳細なデータはTable 5, 13, 14に示す。

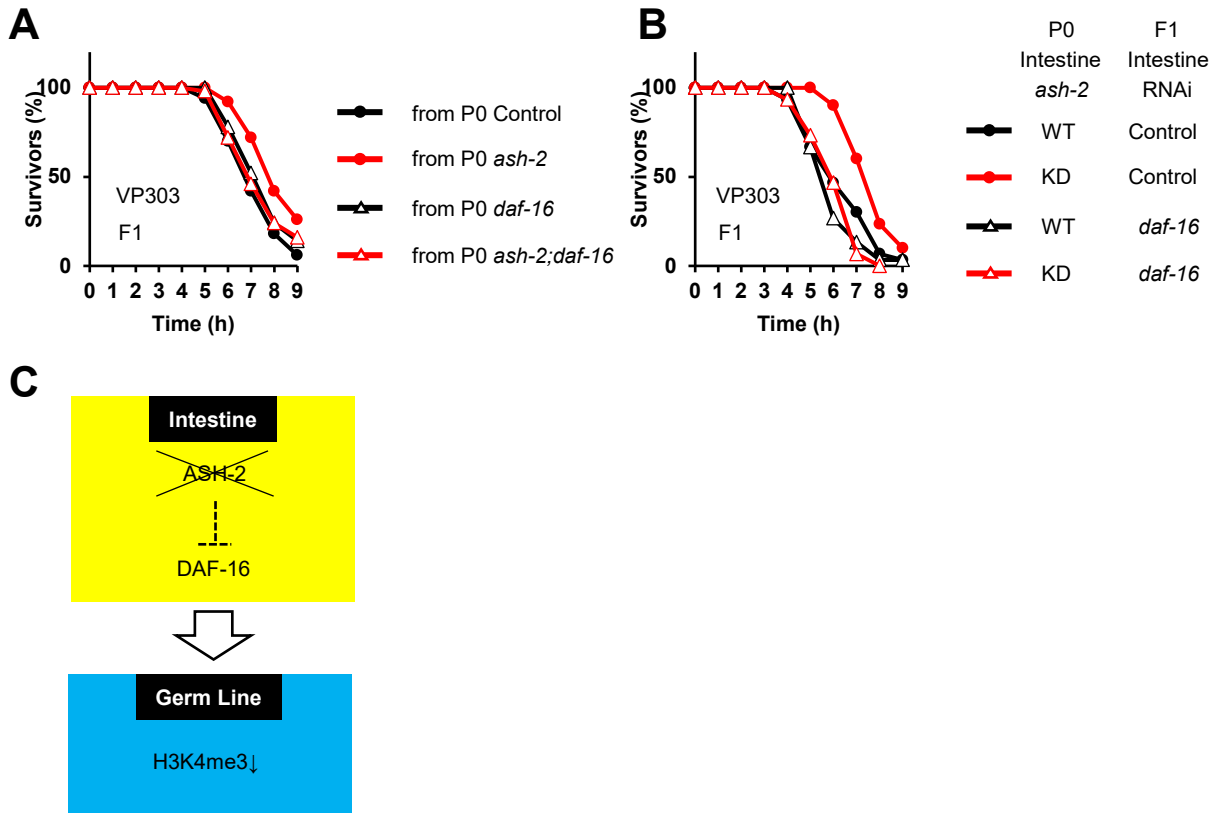


Figure 11 腸組織における*ash-2*の欠損による酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承および次世代での上昇に腸組織のDAF-16が必要である

- (A) 腸組織で*ash-2*と*daf-16*をダブルノックダウンした親世代から生まれた子世代の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。
- (B) 腸組織で*ash-2*をノックダウンした親世代から生まれた子世代において、腸組織で*daf-16*をノックダウンした際の酸化ストレス耐性。実験は2回行っており、代表的なデータを示す。
- (C) 腸組織のDAF-16が生殖腺へ情報を伝達する組織間コミュニケーションのモデル図。各実験における*P*値などの詳細なデータはTable 14, 15に示す。

2-4 *ash-2*の欠損による酸化ストレス耐性上昇および次世代への継承に腸組織の *F08F1.3* が関与する

2-4-1 腸組織における *ash-2*の欠損により発現が減少する遺伝子 *F08F1.3*と *dod-23*のノックダウンにより個体の酸化ストレス耐性が上昇する

個体の酸化ストレス耐性制御における腸-生殖腺の組織間コミュニケーションの分子メカニズムの更なる解析を行うために、腸組織で *ash-2*をノックダウンした際の遺伝子発現の変化を、マイクロアレイを用いて解析した。ヒストン H3K4 トリメチル化のマークは通常、遺伝子発現を活性化させると考えられており(Li and Kelly, 2011)、*ash-2*をノックダウンするとヒストン H3K4 トリメチル化が大きく減少したことから(Figures 5A, B)、*ash-2*のノックダウンにより発現が抑制される遺伝子に着目することにした。そこで、全身および腸組織での *ash-2*ノックダウンにより発現が減少し、酸化ストレス耐性上昇が見られなかった筋肉、神経の *ash-2*ノックダウンで発現が変化しなかった 130 個の遺伝子群を抽出した(Figure 12A)。その中から、組織間コミュニケーションを仲介する候補因子を同定するために、シグナルペプチドの配列を持ったタンパク質に着目した。そして、定量的 RT-PCR を用いて解析し、全身および腸組織での *ash-2*ノックダウンにより発現が減少した遺伝子として *F08F1.3*、*dod-23*、*ttr-46*の 3つの遺伝子を見出した(Figures 12B-D)。先行研究において、*dod-23*は *ash-2*をノックダウンすると発現が減少することが報告されており(Han et al., 2017)、今回の実験結果と一致する。次に、この 3つの遺伝子が酸化ストレス耐性の制御に関与するかについて検討することにした。その結果、全身で *F08F1.3*もしくは *dod-23*をノックダウンすると酸化ストレス耐性が上昇することを見出した(Figure 12E)。一方で、*ttr-46*のノックダウンでは酸化ストレス耐性の上昇は見られなかった(Figure 12E)。さらに、腸組織特異的な *F08F1.3*、*dod-23*のノックダウンでも酸化ストレス耐性が上昇し、*ttr-46*のノックダウンでは酸化ストレス耐性上昇が見られな

った(Figure 12F)。これらの結果から、腸組織での *ash-2* の欠損による *F08F1.3*、*dod-23* の発現抑制が、個体全身の酸化ストレス耐性を上昇させることが示唆された。さらに、腸組織において *F08F1.3*、*dod-23* をそれぞれ *ash-2* と同時にノックダウンしたところ、*ash-2* 単体をノックダウンした時と比較して、酸化ストレス耐性の上昇が相加的ではなかった(Figures 12G, H)。さらに、*F08F1.3::gfp* 融合遺伝子を用いた解析により、*F08F1.3* は主に腸組織で強く発現することが明らかになった(Figure 13A)。また、腸組織で *F08F1.3* を過剰発現させると、腸組織の *ash-2* ノックダウンによる酸化ストレス耐性上昇が抑制されることも分かった(Figure 13B)。以上の結果から、*F08F1.3* および *dod-23* が、腸組織の *ash-2* 欠損による酸化ストレス耐性上昇における腸-生殖腺の組織間コミュニケーションに関与する可能性が示唆された。

2-4-2 腸組織における *F08F1.3* の欠損による酸化ストレス耐性上昇が次世代へ継承される

次に、*F08F1.3* および *dod-23* が、親世代の *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承に関与するかについて検討することにした。そこで、腸組織で *F08F1.3*、*dod-23*、*ttr-46* の各遺伝子をノックダウンし、その線虫から産まれた子世代の線虫の酸化ストレス耐性を測定した。その結果、腸組織で *F08F1.3* をノックダウンした親世代の線虫から産まれた子世代の線虫において、酸化ストレス耐性が上昇することが分かった(Figure 14A)。一方で、腸組織で *dod-23* および *ttr-46* をノックダウンした線虫の子世代では、酸化ストレス耐性の上昇は見られなかった(Figure 14B)。そこで次に、親世代の腸組織以外の各組織で *F08F1.3* をノックダウンし、親世代および子世代の線虫の酸化ストレス耐性の上昇を測定することにした。その結果、生殖腺、皮下組織、筋肉、神経で *F08F1.3* をノックダウンしても個体の酸化ストレス耐性上昇は見られず(Figure 14C)、そこから産まれた子世代の線虫においても酸化ストレ

ス耐性の上昇は見られなかった(Figure 14D)。次に、腸組織で *F08F1.3* をノックアウトした親世代の線虫、および子世代以降の野生型の線虫の酸化ストレス耐性を測定することにした。その結果、腸組織で *F08F1.3* をノックアウトした親世代の線虫において酸化ストレス耐性が上昇し、そこから産まれた F1、F2 世代の野生型の線虫においても酸化ストレス耐性が上昇することが明らかになった(Figures 14E, F)。そして F3 世代の野生型においてはストレス耐性の上昇は見られなかった(Figure 14F)。これらの結果から、親世代の腸組織での *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承に、*F08F1.3* が関与する可能性が示唆された。

2-4-3 酸化ストレス耐性上昇を次世代へと継承する腸-生殖腺のエピジェネティックな情報の伝達に *F08F1.3* が関与する

最後に、親世代の腸組織における *ash-2* および *F08F1.3* の欠損による酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承のメカニズムが、共通であるかを検討した。その結果、腸組織における *ash-2* ノックアウトの実験結果と同様に、腸組織の *F08F1.3* のノックアウトによる酸化ストレス耐性上昇と子世代への継承に、生殖腺の *rbr-2* と *spr-5* が必要であることが分かった(Figures 15A-E)。さらに、子世代における酸化ストレス耐性の上昇には、子世代の腸組織の DAF-16 の機能が必要であることも明らかになった(Figure 15F)。また、*F08F1.3* の発現量が DAF-16 によって制御されるかについて検討した。その結果、野生型の線虫では全身の *ash-2* ノックダウンにより *F08F1.3* の発現量が減少するが、*daf-16* 変異体ではその減少が見られなくなることが分かった(Figure 15G)。さらに、次世代塩基配列解析データベースである modENCODE の ChIP-seq のデータにおいて、*F08F1.3* のプロモーター領域に DAF-16 の結合部位があることが示されており、*F08F1.3* が DAF-16 の標的遺伝子である可能性が示唆された。以上の結果から、*ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性上昇を次世代へと継承す

る腸-生殖腺のエピジェネティックな情報の伝達に F08F1.3 が関与することが示された(Figure 15H)。

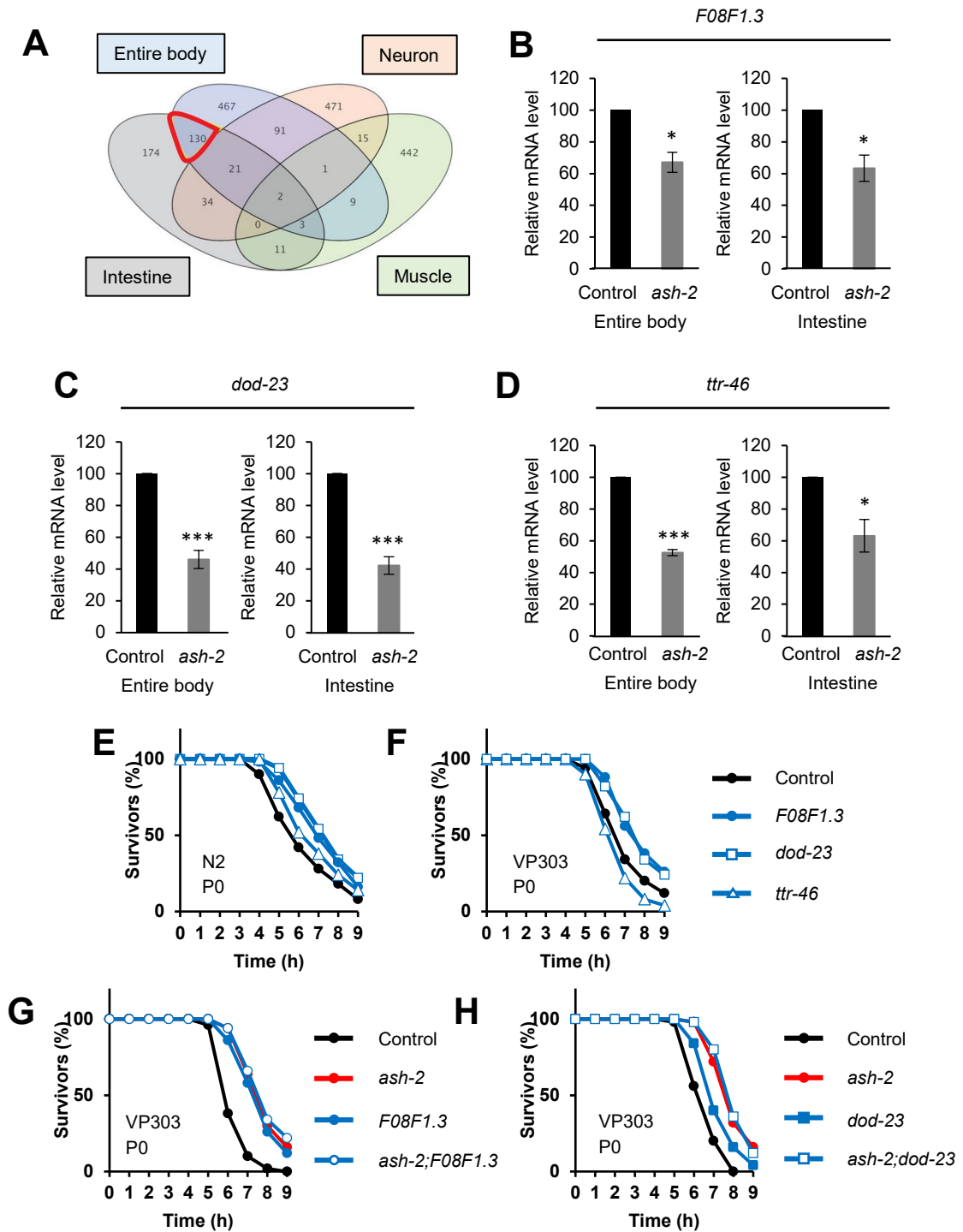


Figure 12 (Figure legendは次のページに示す)

Figure 12 腸組織の*ash-2*の欠損により発現が減少する遺伝子*F08F1.3*と*dod-23*のノックダウンにより個体の酸化ストレス耐性が上昇する

- (A) 全身および腸組織、筋肉、神経の*ash-2*ノックダウンで発現が減少した遺伝子の個数を示したベン図。赤で示した遺伝子群に着目した。
- (B-D) 全身および腸組織で*ash-2*をノックダウンした時の、*F08F1.3*(B)、*dod-23*(C)、*ttr-46*(D)のmRNA発現量。実験は4回行っており、4回の実験の平均値(±標準誤差)を示す。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.005$ 。P値はStudent's t-testにより算出した。
- (E, F) 全身(E)および腸組織(F)で*F08F1.3*、*dod-23*、*ttr-46*をノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性。実験は2回以上行っており、代表的なデータを示す。
- (G) 腸組織で*ash-2*と*F08F1.3*をダブルノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。
- (H) 腸組織で*ash-2*と*dod-23*をダブルノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。
- 各実験におけるP値などの詳細なデータはTable 16, 17に示す。

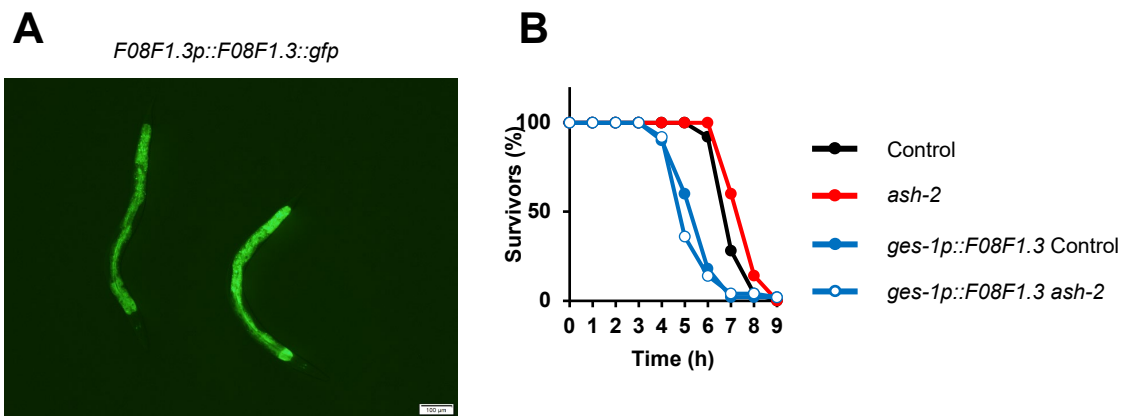


Figure 13 *F08F1.3*は主に腸組織に発現している

(A) *F08F1.3*プロモーター下で*F08F1.3::gfp*を発現させた線虫の写真。GFPの蛍光は、主に腸組織で観察された。スケールバーは100 μm を示す。

(B) 腸組織で*F08F1.3*を過剰発現させた線虫の腸組織で*ash-2*をノックダウンした時の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。各実験における*P*値などの詳細なデータはTable 18に示す。

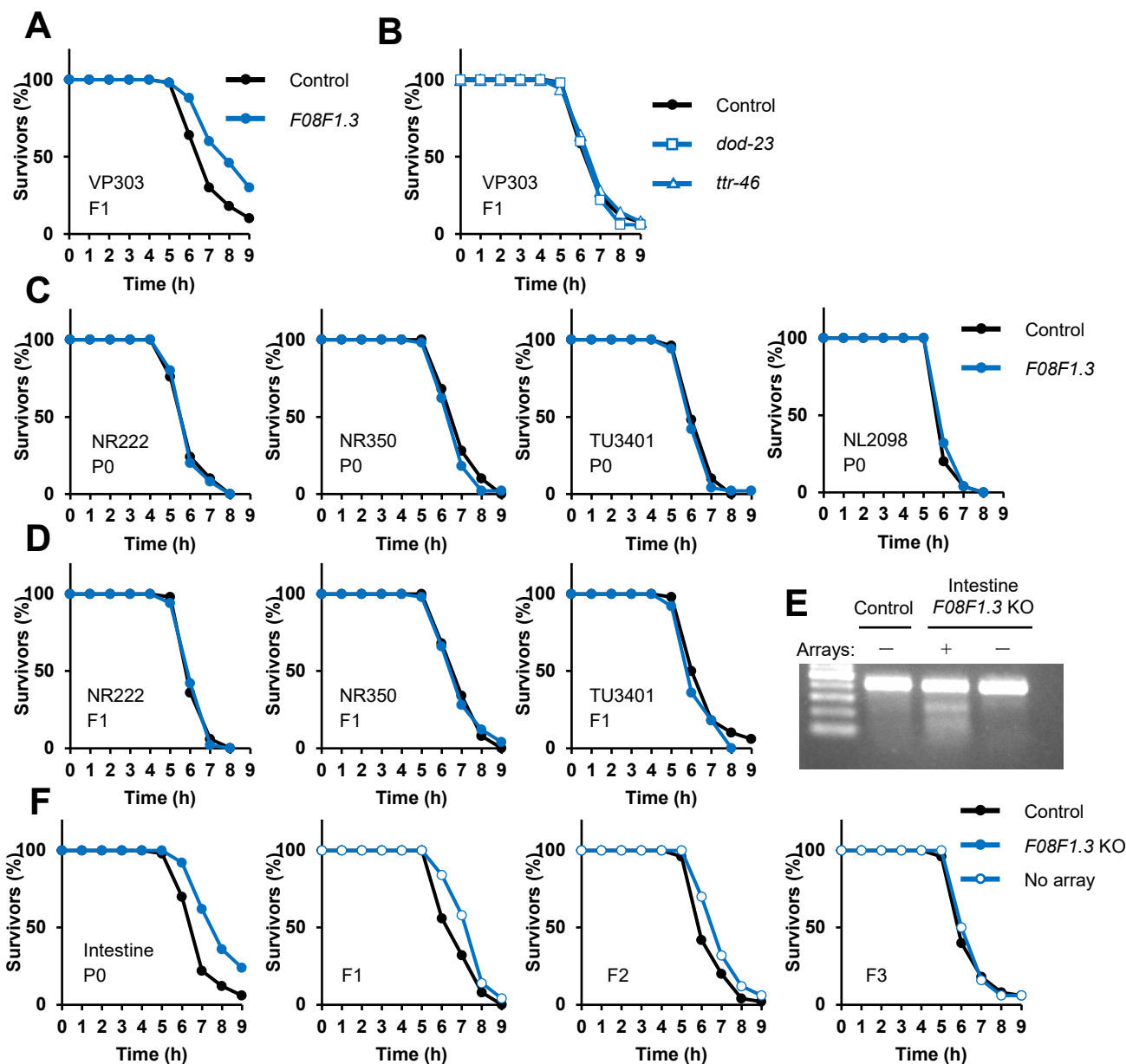


Figure 14 腸組織における*F08F1.3*の欠損による酸化ストレス耐性の上昇が次世代へと継承される

(A, B) 腸組織で*F08F1.3*(A)および*dod-23*、*ttr-46*(B)をノックダウンした親世代から生まれた子世代の酸化ストレス耐性。実験はそれぞれ3回行っており、代表的なデータを示す。

(C, D) 組織特異的に*F08F1.3*をノックダウンした親世代(C)およびそこから生まれた子世代(D)の酸化ストレス耐性。左から皮下組織、筋肉、神経、生殖腺でのノックダウンの結果を示す。実験はそれぞれ3回行っており、代表的なデータを示す。

(E) CRISPR-Cas9を用いた腸組織特異的な*F08F1.3*ノックアウトによる変異導入を確認したT7E1アッセイの結果(左から右: N2、腸組織で*F08F1.3*をノックアウトしたN2、No arrayのN2)。

(F) 腸組織で*F08F1.3*をノックアウトした親世代の線虫およびNo arrayの野生型のF1-F3世代の酸化ストレス耐性。実験は3回行っており、代表的なデータを示す。

各実験における*P*値などの詳細なデータはTable 16, 19に示す。

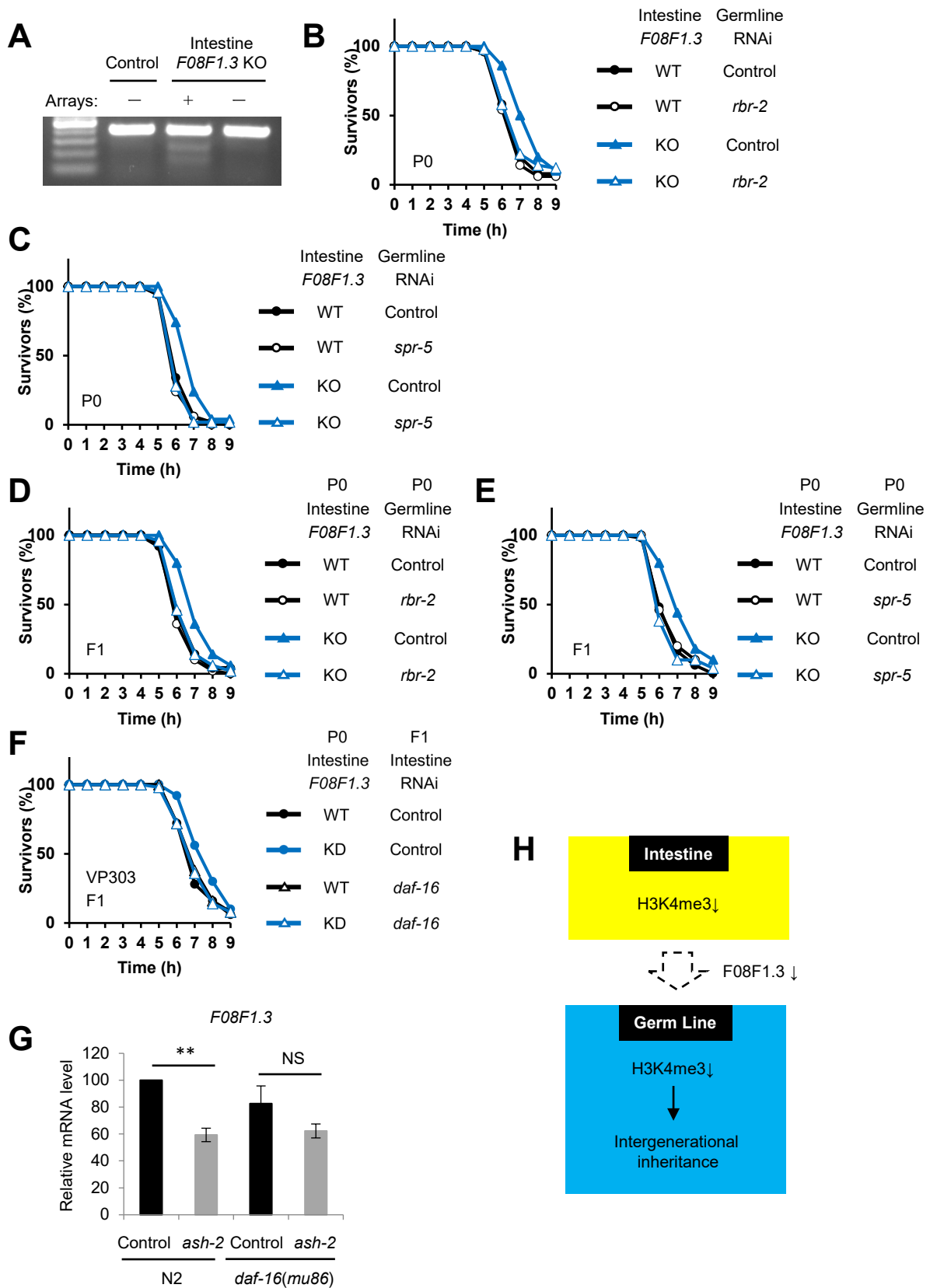


Figure 15 *F08F1.3*の欠損による酸化ストレス耐性上昇は*ash-2*の欠損によるストレス耐性上昇のメカニズムと共通である

(A) CRISPR-Cas9を用いた腸組織特異的な*F08F1.3*ノックアウトによる変異導入を確認したT7E1アッセイの結果(左から右: NL2098、腸組織で*F08F1.3*をノックアウトしたNL2098、No arrayのNL2098)。

(B, C) 腸組織で*F08F1.3*をノックアウトした親世代の線虫の生殖腺で*rbr-2*(B)、*spr-5*(C)をノックダウンした時の酸化ストレス耐性。実験はそれぞれ2回行っており、代表的なデータを示す。

(D, E) 腸組織で*F08F1.3*をノックアウトした親世代の線虫の生殖腺で*rbr-2*(D)、*spr-5*(E)をノックダウンした際の子世代の線虫の酸化ストレス耐性。実験はそれぞれ2回行っており、代表的なデータを示す。

(F) 腸組織で*F08F1.3*をノックダウンした親世代の線虫から生まれた子世代において、腸組織で*daf-16*をノックダウンした際の酸化ストレス耐性。実験は2回行っており、代表的なデータを示す。

(G) N2(左2列)と*daf-16*変異体(*mu86*) (右2列)で*ash-2*をノックダウンした時の*F08F1.3*のmRNA発現量。実験は3回行っており、各実験回で反復した計6回の実験の平均値(±標準誤差)を示す。** $P < 0.01$ 。P値はStudent's t-testにより算出した。

(H) 腸組織の*F08F1.3*の発現減少を介した腸-生殖腺の組織間コミュニケーションのモデル図。

各実験におけるP値などの詳細なデータはTable 20, 21に示す。

Table 1 各ヒストン修飾因子をノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性

Trial	RNAi construct	Mean survival time (h)	±s.e. (h)	# animals (N)	P value	
#1	Control	6.62	0.14	50	-	
	<i>mes-2</i>	6.22	0.07	50	0.0094	
	<i>jmjd-1.2</i>	6.88	0.15	50	0.2376	
	<i>jmjd-3.1</i>	6.4	0.14	50	0.2112	
	<i>met-1</i>	6.42	0.09	50	0.173	
	<i>met-2</i>	7.08	0.18	50	0.0285	
	Control	5.96	0.14	50	-	
	<i>utx-1</i>	6.62	0.15	50	0.0018	
	<i>ash-2</i>	6.92	0.16	50	0.0001	
	<i>wdr-5.1</i>	6.22	0.14	50	0.2933	
	<i>set-2</i>	6.32	0.14	50	0.1292	
	<i>rbr-2</i>	6.42	0.14	50	0.0431	
	#2	Control	6.96	0.15	50	-
		<i>mes-2</i>	6.62	0.13	50	0.1054
<i>jmjd-1.2</i>		6.96	0.13	50	0.9308	
<i>jmjd-3.1</i>		6.92	0.13	50	0.6674	
<i>met-1</i>		6.52	0.11	50	0.0159	
<i>met-2</i>		6.96	0.14	50	0.756	
Control		6.44	0.12	50	-	
<i>utx-1</i>		7.24	0.16	50	0.0003	
<i>ash-2</i>		7.44	0.16	50	<0.0001	
<i>wdr-5.1</i>		6.3	0.08	50	0.2601	
<i>set-2</i>		6.96	0.14	50	0.0159	
<i>rbr-2</i>		6.58	0.14	50	0.554	

Table 2 全身および各組織で*ash-2*を欠損した親世代および子世代の線虫の酸化ストレス耐性

trial	Strain	RNAi	Mean survival time (h)	±s.e. (h)	# animals (N)	P value
#1	N2	Control	6.36	0.18	50	-
	N2	<i>ash-2</i>	7.8	0.17	50	<0.0001
#2	N2	Control	7.02	0.16	50	-
	N2	<i>ash-2</i>	8.06	0.16	50	<0.0001
#3	N2	Control	6.4	0.23	50	-
	N2	<i>ash-2</i>	7.9	0.16	50	<0.0001
#1	N2	Control	5.9	0.07	50	-
	<i>ash-2(tm1905)</i>	Control	6.94	0.16	50	<0.0001
#2	N2	Control	6.06	0.07	50	-
	<i>ash-2(tm1905)</i>	Control	6.74	0.12	50	<0.0001
P0 RNAi						
#1 P0	NL2098	Control	6.83	0.26	40	-
	NL2098	<i>ash-2</i>	7.78	0.2	40	0.0181
#1 P0	NR222	Control	6.45	0.26	40	-
	NR222	<i>ash-2</i>	7.63	0.21	40	0.0029
#1 P0	NR350	Control	6.78	0.32	40	-
	NR350	<i>ash-2</i>	6.85	0.3	40	0.5887
#1 P0	TU3401	Control	6.8	0.29	40	-
	TU3401	<i>ash-2</i>	6.53	0.29	40	0.6249
P0 RNAi						
#1 F1	NR222	Control	6.03	0.21	40	-
	NR222	<i>ash-2</i>	5.95	0.21	40	0.6866
#1 F1	NR350	Control	6	0.24	40	-
	NR350	<i>ash-2</i>	5.75	0.22	40	0.5887
#1 F1	TU3401	Control	5.53	0.22	40	-
	TU3401	<i>ash-2</i>	5.8	0.25	40	0.2983
RNAi						
#2 P0	NL2098	Control	6.72	0.17	50	-
	NL2098	<i>ash-2</i>	7.76	0.15	50	0.0001
#2 P0	NR222	Control	7.26	0.18	50	-
	NR222	<i>ash-2</i>	7.98	0.14	50	0.0461
#2 P0	NR350	Control	7.54	0.17	50	-
	NR350	<i>ash-2</i>	7.42	0.14	50	0.7991
#2 P0	TU3401	Control	6.68	0.09	50	-
	TU3401	<i>ash-2</i>	6.48	0.09	50	0.13
P0 RNAi						
#2 F1	NR222	Control	6.86	0.13	50	-
	NR222	<i>ash-2</i>	7.06	0.15	50	0.1685
#2 F1	NR350	Control	7.24	0.15	50	-
	NR350	<i>ash-2</i>	7.14	0.16	50	0.6432
#2 F1	TU3401	Control	6.68	0.12	50	-
	TU3401	<i>ash-2</i>	6.92	0.14	50	0.1229

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

次のページに続く

RNAi						
#3 P0	NL2098	Control	7.02	0.16	50	-
	NL2098	<i>ash-2</i>	7.66	0.15	50	0.0084
#3 P0	NR222	Control	6.92	0.15	50	-
	NR222	<i>ash-2</i>	7.52	0.15	50	0.005
#3 P0	NR350	Control	7.3	0.16	50	-
	NR350	<i>ash-2</i>	7.68	0.17	50	0.1317
#3 P0	TU3401	Control	6.88	0.17	50	-
	TU3401	<i>ash-2</i>	7.12	0.19	50	0.2938
P0 RNAi						
#3 F1	NR222	Control	6.82	0.13	50	-
	NR222	<i>ash-2</i>	6.62	0.12	50	0.4043
#3 F1	NR350	Control	7.4	0.15	50	-
	NR350	<i>ash-2</i>	7.12	0.17	50	0.4267
#3 F1	TU3401	Control	6.84	0.16	50	-
	TU3401	<i>ash-2</i>	6.68	0.15	50	0.3371
RNAi						
#1 P0	VP303	Control	6.98	0.17	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	8.3	0.12	50	<0.0001
P0 RNAi						
#1 F1	VP303	Control	7.26	0.19	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	8.06	0.13	50	0.0162
#1 F2	VP303	Control	7.08	0.19	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	7.76	0.15	50	0.0493
#1 F3	VP303	Control	7.1	0.16	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	6.76	0.13	50	0.0716
RNAi						
#2 P0	VP303	Control	7.3	0.16	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	8.1	0.14	50	0.0011
P0 RNAi						
#2 F1	VP303	Control	7.14	0.16	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	8.1	0.12	50	<0.0001
#2 F2	VP303	Control	7.22	0.12	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	8.1	0.12	50	<0.0001
#2 F3	VP303	Control	7.2	0.16	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	7.2	0.16	50	0.8837
RNAi						
#3 P0	VP303	Control	7.88	0.11	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	8.36	0.09	50	0.0073
P0 RNAi						
#3 F1	VP303	Control	7.6	0.11	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	8	0.12	50	0.0143
#3 F2	VP303	Control	7	0.1	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	7.56	0.12	50	0.0003
#3 F3	VP303	Control	7.06	0.14	50	-
	VP303	<i>ash-2</i>	7.26	0.13	50	0.4151

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

Table 3 全身および腸組織、生殖腺で*ash-2*と*rbr-2*をダブルノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性

trial	Strain	RNAi	Mean survival time (h)	±s.e. (h)	# animals (N)	P Value	
						vs 1	vs 3
#1	N2	1 Control	6.82	0.12	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	7.42	0.14	50	0.0037	<0.0001
		3 <i>rbr-2</i>	6.6	0.11	50	0.1678	-
		4 <i>ash-2;rbr-2</i>	6.24	0.1	50	0.0008	0.0276
#2	N2	1 Control	6.5	0.14	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	7.46	0.16	50	0.0001	0.0348
		3 <i>rbr-2</i>	6.8	0.16	50	0.1206	-
		4 <i>ash-2;rbr-2</i>	6.7	0.17	50	0.2936	0.6408
#1	NL2098	1 Control	5.82	0.09	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	6.22	0.1	50	0.0057	0.0033
		3 <i>rbr-2</i>	5.8	0.09	50	0.8887	-
		4 <i>ash-2;rbr-2</i>	5.62	0.08	50	0.1057	0.1366
#2	NL2098	1 Control	6.64	0.13	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	7.38	0.14	50	0.0003	<0.0001
		3 <i>rbr-2</i>	6.46	0.13	50	0.3362	-
		4 <i>ash-2;rbr-2</i>	6.3	0.13	50	0.0868	0.4593
#1	VP303	1 Control	6.74	0.16	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	7.6	0.15	50	0.0031	0.0008
		3 <i>rbr-2</i>	6.62	0.17	50	0.544	-
		4 <i>ash-2;rbr-2</i>	6.82	0.18	50	0.7211	0.3624
#2	VP303	1 Control	7.14	0.15	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	7.54	0.15	50	0.0281	0.0258
		3 <i>rbr-2</i>	6.9	0.16	50	0.7806	-
		4 <i>ash-2;rbr-2</i>	6.82	0.16	50	0.4491	0.733

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

Table 4 体細胞組織および腸組織で*rbr-2*をノックアウトした線虫に対して*ash-2*をノックダウンした時の酸化ストレス耐性

trial		Intestine <i>rbr-2</i>	RNAi	Mean survival time (h)	±s.e. (h)	#animals (N)	P Value	
							vs 1	vs 3
#1	1 NL2098	WT	Control	6.56	0.13	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>ash-2</i>	7.06	0.14	50	0.0129	0.0323
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::rbr-2-sg</i>	KO	Control	6.48	0.14	50	0.9519	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::rbr-2-sg</i>	KO	<i>ash-2</i>	7.2	0.15	50	0.0066	0.0066
#2	1 NL2098	WT	Control	6.52	0.13	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>ash-2</i>	7.12	0.15	50	0.0061	0.1267
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::rbr-2-sg</i>	KO	Control	6.64	0.16	50	0.4593	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::rbr-2-sg</i>	KO	<i>ash-2</i>	7	0.17	50	0.2252	0.2252
#3	1 NL2098	WT	Control	6.4	0.1	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>ash-2</i>	7.3	0.13	50	<0.0001	0.0003
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::rbr-2-sg</i>	KO	Control	6.56	0.13	50	0.278	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::rbr-2-sg</i>	KO	<i>ash-2</i>	7.2	0.15	50	0.0016	0.0016
somatic tissues <i>rbr-2</i>								
#1	1 N2	WT	Control	5.96	0.1	50	-	-
	2 N2	WT	<i>ash-2</i>	6.54	0.11	50	0.0004	<0.0001
	3 N2 <i>dpy-30p::Cas9+U6p::rbr-2-sg</i>	KO	Control	5.62	0.11	50	0.011	-
	4 N2 <i>dpy-30p::Cas9+U6p::rbr-2-sg</i>	KO	<i>ash-2</i>	6.36	0.11	50	0.0529	<0.0001
#2	1 N2	WT	Control	6.5	0.12	50	-	-
	2 N2	WT	<i>ash-2</i>	7.02	0.11	50	0.0061	0.0011
	3 N2 <i>dpy-30p::Cas9+U6p::rbr-2-sg</i>	KO	Control	6.2	0.16	50	0.2469	-
	4 N2 <i>dpy-30p::Cas9+U6p::rbr-2-sg</i>	KO	<i>ash-2</i>	7.26	0.12	50	0.0001	<0.0001

Table 5 腸組織で*ash-2*をノックアウトした線虫の生殖腺で*ash-2*および*daf-16*をノックダウンした時の酸化ストレス耐性

trial	Strain	Intestine <i>ash-2</i>	RNAi	Mean survival time (h)	±s.e. (h)	#animals (N)	P Value	
							vs 1	vs 3
#1 P0	1 NL2098	WT	Control	6.54	0.12	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>ash-2</i>	7.38	0.13	50	0.0001	0.589
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	Control	7.4	0.15	50	0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>ash-2</i>	7.32	0.15	50	0.0002	0.8114
	5 NL2098	WT	<i>daf-16</i>	6.38	0.12	50	0.39	<0.0001
	6 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>daf-16</i>	7.22	0.15	50	0.0007	0.425
#2 P0	1 NL2098	WT	Control	6.74	0.14	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>ash-2</i>	7.58	0.13	50	0.0006	0.7234
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	Control	7.62	0.14	50	0.0003	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>ash-2</i>	7.9	0.13	50	<0.0001	0.1592
	5 NL2098	WT	<i>daf-16</i>	7.02	0.11	50	0.1773	0.0018
	6 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>daf-16</i>	7.7	0.14	50	0.0001	0.5895

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

Table 6 腸組織で*ash-2*をノックアウトした線虫の生殖腺でヒストンH3K4脱メチル化酵素をノックダウンした時の酸化ストレス耐性

trial	Strain	Intestine <i>ash-2</i>	RNAi	Mean survival time (h)	±s.e. (h)	#animals (N)	P Value	
							vs 1	vs 3
#1 P0	1 NL2098	WT	Control	6.82	0.13	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>spr-5</i>	6.88	0.12	50	0.9901	0.0013
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	Control	7.48	0.14	50	0.0025	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>spr-5</i>	7.1	0.13	50	0.1899	0.0544
P0 RNAi								
#1 F1	1 NL2098	WT	Control	6.72	0.11	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>spr-5</i>	6.64	0.11	50	0.6888	<0.0001
	3 NL2098 No array	WT	Control	7.72	0.11	50	<0.0001	-
	4 NL2098 No array	WT	<i>spr-5</i>	6.88	0.12	50	0.2912	<0.0001
RNAi								
#2 P0	1 NL2098	WT	Control	6.7	0.09	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>spr-5</i>	6.64	0.1	50	0.7233	0.0001
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	Control	7.32	0.12	50	0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>spr-5</i>	6.56	0.1	50	0.335	<0.0001
P0 RNAi								
#2 F1	1 NL2098	WT	Control	6.64	0.1	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>spr-5</i>	6.7	0.11	50	0.6235	<0.0001
	3 NL2098 No array	WT	Control	7.74	0.11	50	<0.0001	-
	4 NL2098 No array	WT	<i>spr-5</i>	6.78	0.11	50	0.3014	<0.0001
RNAi								
#3 P0	1 NL2098	WT	Control	6.58	0.12	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>spr-5</i>	6.64	0.11	50	0.7692	<0.0001
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	Control	7.58	0.12	50	<0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>spr-5</i>	6.84	0.12	50	0.1574	0.0001
P0 RNAi								
#3 F1	1 NL2098	WT	Control	6.74	0.11	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>spr-5</i>	6.8	0.1	50	0.7315	<0.0001
	3 NL2098 No array	WT	Control	7.64	0.12	50	<0.0001	-
	4 NL2098 No array	WT	<i>spr-5</i>	7.02	0.12	50	0.0607	0.0049
RNAi								
#1 P0	1 NL2098	WT	Control	6.4	0.9	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>rbr-2</i>	6.58	0.9	50	0.1852	<0.0001
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	Control	7.36	0.13	50	<0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>rbr-2</i>	6.48	0.11	50	0.5216	<0.0001
P0 RNAi								
#1 F1	1 NL2098	WT	Control	6.56	0.1	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>rbr-2</i>	6.64	0.1	50	0.6251	<0.0001
	3 NL2098 No array	WT	Control	7.58	0.12	50	<0.0001	-
	4 NL2098 No array	WT	<i>rbr-2</i>	6.62	0.1	50	0.7114	<0.0001
RNAi								
#2 P0	1 NL2098	WT	Control	6.42	0.09	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>rbr-2</i>	6.66	0.1	50	0.0967	<0.0001
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	Control	7.46	0.11	50	<0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>rbr-2</i>	6.72	0.11	50	0.0418	<0.0001
P0 RNAi								
#2 F1	1 NL2098	WT	Control	6.64	0.1	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>rbr-2</i>	6.64	0.1	50	0.9682	<0.0001
	3 NL2098 No array	WT	Control	7.64	0.11	50	<0.0001	-
	4 NL2098 No array	WT	<i>rbr-2</i>	6.7	0.11	50	0.6334	<0.0001
RNAi								
#3 P0	1 NL2098	WT	Control	6.6	1	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>rbr-2</i>	6.66	0.11	50	0.6415	0.0006
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	Control	7.24	0.1	50	<0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>rbr-2</i>	6.68	0.12	50	0.5468	0.004
P0 RNAi								
#3 F1	1 NL2098	WT	Control	6.58	0.11	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>rbr-2</i>	6.84	0.12	50	0.1807	0.003
	3 NL2098 No array	WT	Control	7.38	0.12	50	<0.0001	-
	4 NL2098 No array	WT	<i>rbr-2</i>	6.64	0.09	50	0.5599	<0.0001

次のページに続く

				RNAi				
#1 P0	1 NL2098	WT	Control	6.58	0.09	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>amx-1</i>	6.76	0.13	50	0.2887	0.0009
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	Control	7.52	0.13	50	<0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>amx-1</i>	7.64	0.11	50	<0.0001	0.5013
				P0 RNAi				
#1 F1	1 NL2098	WT	Control	6.72	0.1	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>amx-1</i>	6.52	0.09	50	0.1365	<0.0001
	3 NL2098 No array	WT	Control	7.6	0.12	50	<0.0001	-
	4 NL2098 No array	WT	<i>amx-1</i>	7.54	0.12	50	<0.0001	0.6173
				RNAi				
#2 P0	1 NL2098	WT	Control	6.7	0.12	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>amx-1</i>	6.76	0.13	50	0.792	<0.0001
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	Control	7.7	0.12	50	<0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	KO	<i>amx-1</i>	7.62	0.11	50	<0.0001	0.3942
				P0 RNAi				
#2 F1	1 NL2098	WT	Control	6.76	0.1	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>amx-1</i>	6.86	0.12	50	0.4146	<0.0001
	3 NL2098 No array	WT	Control	7.96	0.11	50	<0.0001	-
	4 NL2098 No array	WT	<i>amx-1</i>	7.86	0.11	50	<0.0001	0.6536
				RNAi				
#1 P0	1 NL2098	WT	Control	6.38	0.1	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>lsd-1</i>	6.54	0.09	50	0.2673	0.0002
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	WT	Control	7.14	0.13	50	<0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	WT	<i>lsd-1</i>	7.1	0.12	50	0.0001	0.9277
				P0 RNAi				
#1 F1	1 NL2098	WT	Control	6.78	0.12	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>lsd-1</i>	6.88	0.14	50	0.5464	<0.0001
	3 NL2098 No array	KO	Control	8	0.12	50	<0.0001	-
	4 NL2098 No array	KO	<i>lsd-1</i>	7.9	0.11	50	<0.0001	0.6971
				RNAi				
#2 P0	1 NL2098	WT	Control	6.9	0.13	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>lsd-1</i>	6.92	0.14	50	0.4649	0.0056
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	WT	Control	7.76	0.13	50	0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2-sg</i>	WT	<i>lsd-1</i>	7.84	0.11	50	<0.0001	0.9245
				P0 RNAi				
#2 F1	1 NL2098	WT	Control	6.64	0.14	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>lsd-1</i>	6.38	0.11	50	0.1106	<0.0001
	3 NL2098 No array	KO	Control	7.56	0.14	50	0.0003	-
	4 NL2098 No array	KO	<i>lsd-1</i>	7.86	0.14	50	<0.0001	0.1492

Table 7 体細胞組織で*rbr-2*をレスキューした線虫の腸組織で*ash-2*をノックアウトした時の酸化ストレス耐性

trial		Intestine <i>ash-2</i>	Mean survival time (h)	±s.e. (h)	#animals (N)	P Value
#1	1 N2	WT	5.68	0.09	50	-
	2 N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	KO	6.34	0.09	50	<0.0001
	3 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::gfp (+)</i>	WT	5.5	0.1	50	-
	4 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::gfp (+); gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	KO	5.62	0.1	50	0.4061
	5 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::rbr-2::gfp (+)</i>	WT	5.52	0.08	50	-
	6 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::rbr-2::gfp (+); gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	KO	5.64	0.1	50	0.3453
#2	1 N2	WT	5.88	0.08	50	-
	2 N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	KO	6.74	0.12	50	<0.0001
	3 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::gfp (+)</i>	WT	5.26	0.11	50	-
	4 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::gfp (+); gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	KO	5.16	0.11	50	0.5416
	5 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::rbr-2::gfp (+)</i>	WT	5.5	0.15	50	-
	6 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::rbr-2::gfp (+); gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	KO	5.2	0.15	50	0.1699
#3	1 N2	WT	5.74	0.07	50	-
	2 N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	KO	6.32	0.1	50	<0.0001
	3 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::gfp (+)</i>	WT	5.14	0.08	50	-
	4 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::gfp (+); gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	KO	5.16	0.1	50	0.8356
	5 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::rbr-2::gfp (+)</i>	WT	5.12	0.11	50	-
	6 <i>rbr-2 (-); rbr-2p::rbr-2::gfp (+); gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	KO	5.06	0.1	50	0.6973

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

Table 8 腸組織および体細胞組織で*ash-2*をノックアウトしたP0およびF1、F2、F3世代の酸化ストレス耐性

trial	Strain	Mean survival time (h)	±s.e.(h)	#animals (N)	P Value
#1 P0	N2	6.3	0.22	50	-
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	7.76	0.16	50	0.0003
#1 F1	N2	6.48	0.18	50	-
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	7.94	0.18	50	< 0.0001
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.64	0.19	50	0.0001
#2 P0	N2	6.36	0.18	50	-
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	7.6	0.18	50	0.0002
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	7.84	0.17	50	< 0.0001
#2 F1	N2	6.92	0.19	50	-
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	7.98	0.15	50	0.001
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.74	0.15	50	0.0036
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	7.9	0.12	50	0.0003
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.84	0.13	50	0.0041
#2 F2	N2	6.32	0.12	50	-
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.26	0.19	50	< 0.0001
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.66	0.15	50	< 0.0001
#2 F3	N2	6.84	0.18	50	-
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.18	0.17	50	0.2612
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	6.88	0.16	50	0.985
#3 P0	N2	7.02	0.16	50	-
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	8	0.14	50	< 0.0001
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	7.92	0.15	50	0.0002
#3 F1	N2	7	0.18	50	-
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	8.2	0.15	50	< 0.0001
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	8.42	0.1	50	< 0.0001
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	8.1	0.14	50	0.0002
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.88	0.15	50	0.0076
#3 F2	N2	6.9	0.16	50	-
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.94	0.12	50	< 0.0001
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.82	0.13	50	0.0001
#3 F3	N2	6.92	0.14	50	-
	N2 <i>dpy30p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.2	0.15	50	0.1815
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7	0.15	50	0.5923
#4 P0	N2	7.68	0.11	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	8.24	0.09	50	0.0001
#4 F1	N2	7.16	0.11	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	7.84	0.1	50	0.0001
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.92	0.12	50	0.0001
#4 F2	N2	6.78	0.13	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	7.4	0.13	50	0.0021
#4 F3	N2	6.62	0.1	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i> No array	6.86	0.12	50	0.1175

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

Table 9 腸組織で*ash-2*をノックアウトしたオス親から交配により産まれたF1世代の酸化ストレス耐性

F1 Descendants (From Intesitne-Specific <i>ash-2</i> Deficient male parents)					
trial		Mean survival time (h)	±s.e. (h)	# animals (N)	P Value
#1 F1	Control	6.28	0.09	50	-
	<i>l-ash2</i> KO	6.92	0.1	50	<0.0001
#2 F1	Control	6.08	0.11	50	-
	<i>l-ash2</i> KO	6.48	0.1	50	0.0124
#3 F1	Control	6.32	0.09	50	-
	<i>l-ash2</i> KO	6.8	0.12	50	0.0013

Table 10 腸組織で*ash-2*をノックアウトした親世代の*hrde-1*変異体およびF1、F2世代の酸化ストレス耐性

trial	Strain	Mean survival time (h)	±s.e.(h)	#animals (N)	P Value	
					vs 1	vs 3
#1 P0	N2	5.74	0.1	50	-	-
	<i>N2 gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg hrde-1(tm1200)</i>	6.22	0.1	50	0.0014	< 0.0001
	<i>hrde-1(tm1200)</i>	4.36	0.09	50	< 0.0001	-
	<i>hrde-1(tm1200) gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	5.2	0.14	50	0.0175	< 0.0001
#1 F1	N2	6.3	0.09	50	-	-
	<i>N2 gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array hrde-1(tm1200)</i>	6.74	0.12	50	0.0021	< 0.0001
	<i>hrde-1(tm1200)</i>	4.64	0.09	50	< 0.0001	-
	<i>hrde-1(tm1200) gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array</i>	4.94	0.11	50	< 0.0001	0.0434
#1 F2	N2	6.2	0.08	50	-	-
	<i>N2 gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array hrde-1(tm1200)</i>	6.6	0.11	50	0.0042	< 0.0001
	<i>hrde-1(tm1200)</i>	5.14	0.09	50	< 0.0001	-
	<i>hrde-1(tm1200) gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array</i>	5.3	0.08	50	< 0.0001	0.2169
#2 P0	N2	5.58	0.11	50	-	-
	<i>N2 gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg hrde-1(tm1200)</i>	6.24	0.15	50	0.0009	< 0.0001
	<i>hrde-1(tm1200)</i>	5.22	0.12	50	0.0447	-
	<i>hrde-1(tm1200) gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	6.38	0.13	50	< 0.0001	< 0.0001
#2 F1	N2	6.36	0.09	50	-	-
	<i>N2 gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array hrde-1(tm1200)</i>	6.84	0.11	50	0.0008	< 0.0001
	<i>hrde-1(tm1200)</i>	5.18	0.12	50	< 0.0001	-
	<i>hrde-1(tm1200) gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array</i>	5.22	0.12	50	< 0.0001	0.8713
#2 F2	N2	6.18	0.08	50	-	-
	<i>N2 gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array hrde-1(tm1200)</i>	6.62	0.1	50	0.0016	< 0.0001
	<i>hrde-1(tm1200)</i>	4.8	0.07	50	< 0.0001	-
	<i>hrde-1(tm1200) gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array</i>	4.98	0.07	50	< 0.0001	0.0753
#3 P0	N2	6.04	0.11	50	-	-
	<i>N2 gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg hrde-1(tm1200)</i>	6.54	0.12	50	0.0035	0.0001
	<i>hrde-1(tm1200)</i>	4.94	0.12	50	< 0.0001	-
	<i>hrde-1(tm1200) gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg</i>	5.76	0.15	50	0.3011	< 0.0001
#3 F1	N2	6.24	0.09	50	-	-
	<i>N2 gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array hrde-1(tm1200)</i>	6.8	0.11	50	0.0002	0.0001
	<i>hrde-1(tm1200)</i>	4.6	0.1	50	< 0.0001	-
	<i>hrde-1(tm1200) gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array</i>	4.84	0.1	50	< 0.0001	0.0947
#3 F2	N2	6.5	0.08	50	-	-
	<i>N2 gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array hrde-1(tm1200)</i>	7.28	0.12	50	< 0.0001	0.0001
	<i>hrde-1(tm1200)</i>	5.36	0.08	50	< 0.0001	-
	<i>hrde-1(tm1200) gly-19p::Cas9+ U6p::ash-2-sg No array</i>	5.38	0.09	50	< 0.0001	0.8549

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

Table 11 腸組織で*ash-2*をノックアウトした親世代の線虫から生まれた子世代において生殖腺で*rbr-2*および*spr-5*をノックダウンした時の酸化ストレス耐性

trial	Strain	P0 Intestine	<i>ash-2</i>	P0 RNAi/F1 RNAi	Mean survival time (h)	±s.e. (h)	#animals (N)	P Value	
								vs 1	vs 3
#1 F1	1 NL2098	WT		Control/Control	6.48	0.12	50	-	-
	2 NL2098	WT		Control/ <i>rbr-2</i>	6.42	0.11	50	0.6726	< 0.0001
	3 NL2098	<i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2</i> -sg No array	KO	Control/Control	7.28	0.13	50	0.0001	-
	4 NL2098	<i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2</i> -sg No array	KO	Control/ <i>rbr-2</i>	6.58	0.14	50	0.5575	0.0021
	5 NL2098	WT		Control/ <i>spr-5</i>	6.4	0.15	50	0.6741	< 0.0001
	6 NL2098	<i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2</i> -sg No array	KO	Control/ <i>spr-5</i>	6.78	0.15	50	0.1304	0.0289
#2 F1	1 NL2098	WT		Control/Control	6.3	0.09	50	-	-
	2 NL2098	WT		Control/ <i>rbr-2</i>	6.22	0.09	50	0.5211	0.0013
	3 NL2098	<i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2</i> -sg No array	KO	Control/Control	6.68	0.1	50	0.0102	-
	4 NL2098	<i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2</i> -sg No array	KO	Control/ <i>rbr-2</i>	6.12	0.07	50	0.1286	0.0001
	5 NL2098	WT		Control/ <i>spr-5</i>	6.22	0.07	50	0.4539	0.0003
	6 NL2098	<i>gly-19p::Cas9+U6p::ash-2</i> -sg No array	KO	Control/ <i>spr-5</i>	6.22	0.1	50	0.5503	0.0026

Table 12 腸組織で*ash-2*をノックダウンした親世代の線虫から生まれた子世代において腸組織で*rbr-2*をノックダウンした時の酸化ストレス耐性

trial	Strain	P0 RNAi/F1 RNAi	Mean survival time (h)	±s.e. (h)	#animals (N)	P Value	
						vs 1	vs 3
#1 F1	1 VP303	Control/Control	7.16	0.14	50	-	-
	2	<i>ash-2</i> /Control	7.66	0.15	50	0.0395	0.0061
	3	Control/ <i>rbr-2</i>	7.14	0.14	50	0.6773	-
	4	<i>ash-2/rbr-2</i>	7.64	0.13	50	0.0199	0.0043
#2 F1	1 VP303	Control/Control	7.18	0.16	50	-	-
	2	<i>ash-2</i> /Control	7.86	0.15	50	0.0099	0.0003
	3	Control/ <i>rbr-2</i>	7.04	0.14	50	0.3704	-
	4	<i>ash-2/rbr-2</i>	7.7	0.16	50	0.006	0.006

Table 13 *ash-2*をノックダウンした*daf-16*変異体および*skn-1*変異体の酸化ストレス耐性

trial	Strain	RNAi	Mean survival time (h)	±s.e. (h)	# animals (N)	P Value
#1	N2	Control	6.3	0.22	50	-
	N2	<i>ash-2</i>	7.62	0.18	50	0.0007
	<i>daf-16(mu86)</i>	Control	6.2	0.23	50	-
	<i>daf-16(mu86)</i>	<i>ash-2</i>	6.4	0.24	50	0.5671
#2	N2	Control	7.04	0.13	50	-
	N2	<i>ash-2</i>	7.98	0.11	50	<0.0001
	<i>daf-16(mu86)</i>	Control	7	0.14	50	-
	<i>daf-16(mu86)</i>	<i>ash-2</i>	6.98	0.16	50	0.706
	<i>skn-1(zu135)</i>	Control	6.6	0.16	50	-
	<i>skn-1(zu135)</i>	<i>ash-2</i>	7.82	0.14	50	<0.0001
#3	N2	Control	7.44	0.14	50	-
	N2	<i>ash-2</i>	8.12	0.12	50	0.0003
	<i>daf-16(mu86)</i>	Control	7.28	0.15	50	-
	<i>daf-16(mu86)</i>	<i>ash-2</i>	7.16	0.15	50	0.3607
	<i>skn-1(zu135)</i>	Control	6.9	0.15	50	-
	<i>skn-1(zu135)</i>	<i>ash-2</i>	7.66	0.16	50	0.0012

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

Table 14 腸組織と生殖腺で*ash-2*と*daf-16*をダブルノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性

trial	Strain	RNAi	Mean survival time (h)	±s.e. (h)	# animals (N)	P Value	
						vs 1	vs 3
#1 P0	VP303	1 Control	7.02	0.16	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	8.04	0.15	50	<0.0001	0.0001
		3 <i>daf-16</i>	7.06	0.17	50	0.764	-
		4 <i>ash-2;daf-16</i>	7.32	0.16	50	0.2098	0.3682
P0 RNAi							
#1 F1	VP303	1 Control	7.24	0.17	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	7.98	0.14	50	0.0014	0.0773
		3 <i>daf-16</i>	7.54	0.15	50	0.1569	-
		4 <i>ash-2;daf-16</i>	7.4	0.16	50	0.2636	0.8067
RNAi							
#2 P0	VP303	1 Control	7.38	0.16	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	8.38	0.13	50	<0.0001	<0.0001
		3 <i>daf-16</i>	7.02	0.17	50	0.2024	-
		4 <i>ash-2;daf-16</i>	7.4	0.15	50	0.9215	0.2299
P0 RNAi							
#2 F1	VP303	1 Control	7.38	0.15	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	8.04	0.12	50	0.0108	0.0001
		3 <i>daf-16</i>	7.18	0.14	50	0.2148	-
		4 <i>ash-2;daf-16</i>	6.86	0.12	50	0.0022	0.049
RNAi							
#3 P0	VP303	1 Control	7.72	0.12	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	8.44	0.1	50	0.0003	<0.0001
		3 <i>daf-16</i>	7.42	0.12	50	0.0272	-
		4 <i>ash-2;daf-16</i>	7.34	0.14	50	0.1125	0.6984
RNAi							
#4 P0	VP303	1 Control	6.88	0.12	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	7.88	0.11	50	<0.0001	<0.0001
		3 <i>daf-16</i>	6.88	0.1	50	0.8835	-
		4 <i>ash-2;daf-16</i>	7.26	0.11	50	0.1234	0.0145
P0 RNAi							
#4 F1	VP303	1 Control	6.5	0.11	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	7.12	0.12	50	0.0005	<0.0001
		3 <i>daf-16</i>	6.44	0.09	50	0.6838	-
		4 <i>ash-2;daf-16</i>	6.38	0.09	50	0.4017	0.6356
RNAi							
#1	NL2098	1 Control	6.22	0.1	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	6.7	0.13	50	0.0046	0.0011
		3 <i>daf-16</i>	6.16	0.09	50	0.6426	-
		4 <i>ash-2;daf-16</i>	6.7	0.14	50	0.0038	0.0009
#2	NL2098	1 Control	6.1	0.09	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	7.1	0.14	50	<0.0001	<0.0001
		3 <i>daf-16</i>	6.08	0.1	50	0.9227	-
		4 <i>ash-2;daf-16</i>	7.22	0.12	50	<0.0001	<0.0001
#3	NL2098	1 Control	6.22	0.11	50	-	-
		2 <i>ash-2</i>	7.1	0.14	50	<0.0001	0.0001
		3 <i>daf-16</i>	6.26	0.12	50	0.7034	-
		4 <i>ash-2;daf-16</i>	7.04	0.13	50	<0.0001	0.0001

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

Table 15 腸組織で*ash-2*をノックダウンした親世代の線虫から生まれた子世代において腸組織で*daf-16*をノックダウンした時の酸化ストレス耐性

trial	Strain	P0 RNAi/F1 RNAi	Mean Survival Time (h)	±s.e.(h)	#animals (N)	P Value	
						vs 1	vs 3
#1 F1	VP303	1 Control/Control	6.43	0.26	30	-	-
		2 <i>ash-2</i> /Control	7.73	0.17	30	0.0022	<0.0001
		3 Control/ <i>daf-16</i>	6.1	0.2	30	0.2946	-
		4 <i>ash-2</i> / <i>daf-16</i>	6.2	0.19	30	0.2121	0.6997
#2 F1	VP303	1 Control/Control	5.93	0.27	30	-	-
		2 <i>ash-2</i> /Control	7.1	0.23	30	0.0091	0.0133
		3 Control/ <i>daf-16</i>	6.2	0.24	30	0.6797	-
		4 <i>ash-2</i> / <i>daf-16</i>	5.93	0.27	30	0.9439	0.7312

Table 16 全身および各組織で*F08F1.3*、*dod-23*、*ttr-46*をノックダウンした親世代の線虫および子世代の酸化ストレス耐性

trial	Strain	RNAi	Mean survival time (h)	±s.e.(h)	#animals (N)	P Value
#1	N2	Control	6.4	0.23	50	-
		<i>dod-23</i>	7.56	0.18	50	0.0013
		<i>F08F1.3</i>	7.32	0.21	50	0.0149
		<i>ttr-46</i>	6.92	0.21	50	0.1374
#2	N2	Control	6.84	0.13	50	-
		<i>dod-23</i>	7.32	0.13	50	0.0148
		<i>F08F1.3</i>	7.42	0.14	50	0.0036
		<i>ttr-46</i>	7	0.13	50	0.3648
#1 P0	VP303	Control	6.32	0.17	50	-
		<i>dod-23</i>	7.28	0.16	50	0.0005
		<i>F08F1.3</i>	7.14	0.14	50	0.0029
		<i>ttr-46</i>	6.7	0.16	50	0.2059
#2 P0	VP303	Control	7.12	0.17	50	-
		<i>dod-23</i>	7.78	0.16	50	0.0132
		<i>F08F1.3</i>	7.82	0.15	50	0.0076
		<i>ttr-46</i>	6.74	0.15	50	0.0778
#2 F1	VP303	P0 RNAi				
		Control	7.1	0.16	50	-
		<i>dod-23</i>	7.14	0.15	50	0.7726
		<i>F08F1.3</i>	7.92	0.16	50	0.0007
#3 P0	VP303	Control	6.92	0.15	50	-
		<i>dod-23</i>	7.78	0.14	50	0.0006
		<i>F08F1.3</i>	8	0.14	50	<0.0001
		<i>ttr-46</i>	7.26	0.14	50	0.2314
#3 F1	VP303	P0 RNAi				
		Control	6.92	0.15	50	-
		<i>dod-23</i>	6.86	0.13	50	0.8086
		<i>F08F1.3</i>	7.42	0.15	50	0.0238
		<i>ttr-46</i>	7	0.16	50	0.7405

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

次のページに続く

RNAi						
#1 P0	NL2098	Control	6.04	0.07	50	-
	NL2098	<i>F08F1.3</i>	6.1	0.1	50	0.5614
	NR222	Control	6.56	0.11	50	-
	NR222	<i>F08F1.3</i>	6.5	0.09	50	0.5524
	NR350	Control	7.06	0.13	50	-
	NR350	<i>F08F1.3</i>	7.04	0.13	50	0.6909
	TU3401	Control	6.02	0.09	50	-
	TU3401	<i>F08F1.3</i>	6.76	0.1	50	<0.0001
P0 RNAi						
#1 F1	NR222	Control	6.68	0.1	50	-
	NR222	<i>F08F1.3</i>	6.66	0.1	50	0.902
	NR350	Control	6.76	0.1	50	-
	NR350	<i>F08F1.3</i>	6.5	0.1	50	0.1017
	TU3401	Control	7.24	0.16	50	-
	TU3401	<i>F08F1.3</i>	7.42	0.15	50	0.3241
RNAi						
#2 P0	NL2098	Control	6.36	0.09	50	-
	NL2098	<i>F08F1.3</i>	6.56	0.1	50	0.1545
	NR222	Control	6.64	0.1	50	-
	NR222	<i>F08F1.3</i>	6.72	0.1	50	0.6218
	NR350	Control	6.9	0.13	50	-
	NR350	<i>F08F1.3</i>	7	0.12	50	0.9389
	TU3401	Control	6.54	0.1	50	-
	TU3401	<i>F08F1.3</i>	6.42	0.1	50	0.4374
P0 RNAi						
#2 F1	NR222	Control	6.66	0.12	50	-
	NR222	<i>F08F1.3</i>	6.48	0.1	50	0.2625
	NR350	Control	7.74	0.15	50	-
	NR350	<i>F08F1.3</i>	7.56	0.14	50	0.1456
	TU3401	Control	6.46	0.11	50	-
	TU3401	<i>F08F1.3</i>	6.48	0.09	50	0.8746
RNAi						
#3 P0	NL2098	Control	6.24	0.07	50	-
	NL2098	<i>F08F1.3</i>	6.36	0.08	50	0.2873
	NR222	Control	6.1	0.12	50	-
	NR222	<i>F08F1.3</i>	6.08	0.11	50	0.9047
	NR350	Control	7.06	0.13	50	-
	NR350	<i>F08F1.3</i>	6.8	0.11	50	0.2081
	TU3401	Control	6.26	0.08	50	-
	TU3401	<i>F08F1.3</i>	6.12	0.07	50	0.2011
P0 RNAi						
#3 F1	NR222	Control	6.4	0.09	50	-
	NR222	<i>F08F1.3</i>	6.38	0.09	50	0.9291
	NR350	Control	7.1	0.13	50	-
	NR350	<i>F08F1.3</i>	7.04	0.14	50	0.9191
	TU3401	Control	6.76	0.14	50	-
	TU3401	<i>F08F1.3</i>	6.46	0.12	50	0.1016

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

Table 17 腸組織で*ash-2*と*F08F1.3*、および*ash-2*と*dod-23*をダブルノックダウンした線虫の酸化ストレス耐性

trial	Strain	RNAi	Mean survival time (h)	±s.e.(h)	#animals (N)	P Value	
						vs 1	vs 3
#1	VP303	Control	7.12	0.14	50	-	-
		<i>ash-2</i>	8.44	0.11	50	< 0.0001	0.0333
		<i>dod-23</i>	8.04	0.13	50	< 0.0001	-
		<i>ash-2;dod-23</i>	8.58	0.1	50	< 0.0001	0.0006
#2	VP303	Control	6.48	0.14	50	-	-
		<i>ash-2</i>	7.8	0.11	50	< 0.0001	0.0687
		<i>dod-23</i>	8.04	0.13	50	< 0.0001	-
		<i>ash-2;dod-23</i>	8.02	0.11	50	< 0.0001	0.1213
#3	VP303	Control	6.74	0.11	50	-	-
		<i>ash-2</i>	8.02	0.11	50	< 0.0001	0.0012
		<i>dod-23</i>	7.4	0.13	50	0.0004	-
		<i>ash-2;dod-23</i>	8.14	0.11	50	< 0.0001	0.0003
#1	VP303	Control	6.46	0.11	50	-	-
		<i>ash-2</i>	7.88	0.13	50	< 0.0001	0.4101
		<i>F08F1.3</i>	7.7	0.14	50	< 0.0001	-
		<i>ash-2;F08F1.3</i>	7.94	0.13	50	< 0.0001	0.1626
#2	VP303	Control	6.6	0.11	50	-	-
		<i>ash-2</i>	7.7	0.12	50	< 0.0001	0.5198
		<i>F08F1.3</i>	7.62	0.12	50	< 0.0001	-
		<i>ash-2;F08F1.3</i>	7.66	0.12	50	< 0.0001	0.8579
#3	VP303	Control	6.98	0.15	50	-	-
		<i>ash-2</i>	7.58	0.12	50	0.0262	0.4225
		<i>F08F1.3</i>	7.64	0.13	50	0.004	-
		<i>ash-2;F08F1.3</i>	7.64	0.13	50	0.0112	0.7333

Table 18 腸組織で*F08F1.3*を過剰発現させた線虫の腸組織で*ash-2*をノックダウンした時の酸化ストレス耐性

trial	Strain	RNAi	Mean survival time (h)	±s.e.(h)	#animals (N)	P Value	
						vs 1	vs 3
#1	VP303	Control	6.92	0.19	50	-	-
	VP303	<i>ash-2</i>	7.48	0.19	50	0.0305	0.0016
	VP303 <i>ges-1p::F08F1.3</i>	Control	6.4	0.22	50	0.1627	-
	VP303 <i>ges-1p::F08F1.3</i>	<i>ash-2</i>	6	0.18	50	0.0047	0.2503
#2	VP303	Control	5.92	0.09	50	-	-
	VP303	<i>ash-2</i>	6.36	0.08	50	0.001	< 0.0001
	VP303 <i>ges-1p::F08F1.3</i>	Control	5.1	0.11	50	< 0.0001	-
	VP303 <i>ges-1p::F08F1.3</i>	<i>ash-2</i>	4.72	0.12	50	0.0197	< 0.0001
#3	VP303	Control	7.24	0.09	50	-	-
	VP303	<i>ash-2</i>	7.74	0.1	50	0.0007	< 0.0001
	VP303 <i>ges-1p::F08F1.3</i>	Control	5.72	0.14	50	< 0.0001	-
	VP303 <i>ges-1p::F08F1.3</i>	<i>ash-2</i>	5.5	0.15	50	< 0.0001	0.188

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

Table 19 腸組織でF08F1.3をノックアウトしたP0およびF1、F2、F3世代の酸化ストレス耐性

trial	Strain	Mean survival time (h)	±s.e.(h)	#animals (N)	P Value
#1 P0	N2	7.02	0.14	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg</i>	7.9	0.14	50	0.0001
#1 F1	N2	6.96	0.14	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg No array</i>	7.56	0.13	50	0.0046
#1 F2	N2	6.36	0.1	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg No array</i>	6.82	0.12	50	0.0032
#1 F3	N2	6.62	0.14	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg No array</i>	6.72	0.12	50	0.5958
#2 P0	N2	6.32	0.11	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg</i>	7	0.13	50	0.0003
#2 F1	N2	6.32	0.11	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg No array</i>	6.76	0.13	50	0.014
#2 F2	N2	6.62	0.13	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg No array</i>	7.14	0.14	50	0.0157
#2 F3	N2	6.4	0.12	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg No array</i>	6.36	0.13	50	0.8772
#3 P0	N2	6.4	0.09	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg</i>	6.82	0.11	50	0.0033
#3 F1	N2	6.34	0.08	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg No array</i>	7.32	0.16	50	<0.0001
#3 F2	N2	6.4	0.11	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg No array</i>	7.12	0.15	50	0.0002
#3 F3	N2	6.24	0.09	50	-
	N2 <i>gly-19p::Cas9+ U6p::F08F1.3-sg No array</i>	6.48	0.11	50	0.0955

Table 20 腸組織でF08F1.3をノックアウトした線虫の生殖腺で*rbr-2*および*spr-5*をノックダウンした時の酸化ストレス耐性

trial	Strain	Intestine F08F1.3	RNAi	Mean survival time (h)	±s.e.(hrs)	#animals (N)	P Value	
							vs 1	vs 3
#1 P0	1 NL2098	WT	Control	6.38	0.1	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>rbr-2</i>	6.16	0.09	50	0.1106	< 0.0001
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg</i>	KO	Control	7.02	0.11	50	0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg</i>	KO	<i>rbr-2</i>	6.54	0.13	50	0.291	0.0061
	5 NL2098	WT	<i>spr-5</i>	6.24	0.09	50	0.3089	< 0.0001
	6 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg</i>	KO	<i>spr-5</i>	6.28	0.09	50	0.637	< 0.0001
P0 Intestine F08F1.3 P0 RNAi								
#1 F1	1 NL2098	WT	Control	6.42	0.11	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>rbr-2</i>	6.54	0.13	50	0.3461	0.001
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg No array</i>	KO	Control	7.3	0.13	50	< 0.0001	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg No array</i>	KO	<i>rbr-2</i>	6.62	0.13	50	0.2122	0.0012
	5 NL2098	WT	<i>spr-5</i>	6.24	0.1	50	0.2243	< 0.0001
	6 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg No array</i>	KO	<i>spr-5</i>	6.4	0.13	50	0.9435	< 0.0001
#2 P0	1 NL2098	WT	Control	6.82	0.14	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>rbr-2</i>	6.7	0.13	50	0.5296	0.0003
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg</i>	KO	Control	7.56	0.14	50	0.0044	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg</i>	KO	<i>rbr-2</i>	6.92	0.15	50	0.6442	0.0378
	5 NL2098	WT	<i>spr-5</i>	6.94	0.14	50	0.7388	0.0163
	6 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg</i>	KO	<i>spr-5</i>	6.88	0.12	50	0.9326	0.0005
P0 Intestine F08F1.3 P0 RNAi								
#2 F1	1 NL2098	WT	Control	6.68	0.13	50	-	-
	2 NL2098	WT	<i>rbr-2</i>	6.78	0.12	50	0.435	0.0029
	3 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg No array</i>	KO	Control	7.42	0.14	50	0.0002	-
	4 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg No array</i>	KO	<i>rbr-2</i>	6.88	0.15	50	0.1247	0.0493
	5 NL2098	WT	<i>spr-5</i>	6.76	0.14	50	0.4266	0.007
	6 NL2098 <i>gly-19p::Cas9+U6p::F08F1.3-sg No array</i>	KO	<i>spr-5</i>	6.58	0.13	50	0.9269	0.0003

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

Table 21 腸組織でF08F1.3をノックダウンした親世代の線虫から産まれた子世代において腸組織でdaf-16をノックダウンした時の酸化ストレス耐性

trial	Strain	P0 RNAi/F1 RNAi	Mean Survival Time (h)	±s.e.(hrs)	#animals (N)	P Value	
						vs 1	vs 3
#1 F1 VP303	1	Control/Control	7.16	0.14	50	-	-
	2	F08F1.3/Control	7.78	0.14	50	0.0117	0.0494
	3	Control/daf-16	7.26	0.15	50	0.6166	-
	4	F08F1.3/daf-16	7.2	0.15	50	0.7453	0.8535
#2 F1 VP303	1	Control/Control	6.64	0.11	50	-	-
	2	F08F1.3/Control	7.2	0.14	50	0.002	<0.0001
	3	Control/daf-16	6.34	0.1	50	0.0546	-
	4	F08F1.3/daf-16	6.36	0.1	50	0.0796	0.8792

各Figureに用いた実験回をグレーで示す。

考察

本研究により私は、腸-生殖腺間においてエピジェネティック情報を伝達する機構が存在し、この組織間コミュニケーションが個体の酸化ストレス耐性を上昇させ、さらにその効果が世代を越えて受け継がれることを発見した。これまでの研究により、エピジェネティクスの制御機構がストレス応答を含む生体の恒常性維持に関与することが知られていた(Ikeda et al., 2017; Jin et al., 2011; Riedel et al., 2013; Siebold et al., 2010)。また近年、線虫において特定の組織のエピジェネティック修飾因子が個体全身の酸化ストレス耐性に影響を及ぼすことが報告されている(Su et al., 2018)。しかし、エピジェネティクス制御因子による個体の酸化ストレス耐性の制御において、各組織がどのように協調・連携しているのかについてはその大部分が明らかになっていなかった。本研究では、ヒストン H3K4 トリメチル化修飾因子である *ash-2* を腸組織で欠損すると個体の酸化ストレス耐性が上昇すること、さらにそのストレス耐性の上昇に生殖腺の H3K4 脱メチル化酵素の RBR-2 が必要であることが明らかになった。さらに興味深いことに、腸組織の *ash-2* の欠損が、生殖腺におけるエピジェネティック変化を引き起こすことが明らかになり、この腸-生殖腺の組織間コミュニケーションが個体の酸化ストレス耐性を上昇させることが分かった。

また本研究により、腸-生殖腺の組織間コミュニケーションにおいて、腸組織の転写因子 DAF-16 の機能が必要であることが示された。さらに、*ash-2* の欠損により発現が減少する遺伝子として F08F1.3 を同定し、F08F1.3 が個体の酸化ストレス耐性制御に関与することも明らかにした。F08F1.3 は機能未知のタンパク質であるが、構造的な特徴として分泌タンパク質の目印であるシグナルペプチドの配列と、小胞輸送に関与する膜貫通ドメインを有することが分かっている。また本研究により、F08F1.3 は主に腸組

織で発現すること、さらに、腸組織で欠損した時にのみ酸化ストレス耐性が上昇し、その効果が次世代へと継承されることが明らかになった。以上のことを踏まえると、F08F1.3 は腸組織から生殖腺への情報伝達を担う分泌タンパク質や小胞輸送に関与するタンパク質である可能性が考えられる。しかし、その分子実態については未知な部分が多く、詳細な機能を明らかにすることが今後の課題であると考えている。

さらに本研究によって、腸組織における *ash-2* の欠損による酸化ストレス耐性の上昇の次世代への継承に、small RNA を含むエピジェネティック機構が関与することが示唆された。HRDE-1 は、生殖腺特異的に発現する Argonaute タンパク質であり、生殖腺において NRDE タンパク質と協調してヒストン H3K9 のメチル化を促進させ、RNA polymerase II を阻害することで遺伝子発現を抑制する (Ashe et al., 2012; Gu et al., 2012; Buckley et al., 2012; Luteijn et al., 2012)。また、このヒストン H3K9 のメチル化にはメチル化酵素である SET-25 と SET-32 が必要であることも知られている (Spracklin et al 2017; Woodhouse et al., 2018; Kalinava et al., 2017)。さらに HRDE-1 は、親世代で受けた環境刺激によって引き起こされる内在性の siRNA 量の変化が次世代へと継承される上で機能することが知られている (Ni et al., 2016; Rechavi et al., 2014; Moore et al., 2019)。本研究において、酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承に HRDE-1 が必要であることから、ヒストン修飾を介した酸化ストレス耐性上昇の次世代への継承において、生殖腺の small RNA 経路が重要な役割を果たすことが示唆された。

先行研究によって、親世代で獲得した形質の次世代への継承に生殖腺における DNA メチル化状態の変化と、small non-coding RNA を仲介した体細胞-生殖腺の組織間コミュニケーションが重要であることが明らかになりつつある (Devanapally et al., 2015; Dias and Ressler, 2014; Greer et al., 2011; Kishimoto et al., 2017; Moore et al.; Posner et al., 2019)。しかし、体細胞組織におけるヒストン修飾の変化が、子世代の表現型に

影響を与えるかどうかについては知られていなかった。本研究によって、腸組織から生殖腺へとヒストン修飾の情報が伝達され、数世代に渡って酸化ストレス耐性の上昇が受け継がれることが明らかになった。近年、環境刺激によって獲得した親世代の形質の次世代への継承において、体細胞-生殖腺の組織間コミュニケーションや生殖腺でのエピジェネティック変化が重要であることが報告されつつあるため(Devanapally et al., 2015; Dias and Ressler, 2014; Greer et al., 2011; Kishimoto et al., 2017; Moore et al.; Posner et al., 2019)、今回明らかになった分子機構が、親世代で獲得した環境ストレスへの耐性上昇の次世代への継承においても機能する可能性が考えられる。

以上の考察をまとめたモデル図を Figure 16 に示す。本研究で得られた結果により、組織間におけるエピジェネティクスの情報伝達を介して、親世代の個体の酸化ストレス耐性を上昇させ、さらにその効果を次世代へと継承させる腸-生殖腺の組織間コミュニケーションの分子メカニズムの一端が明らかになった。

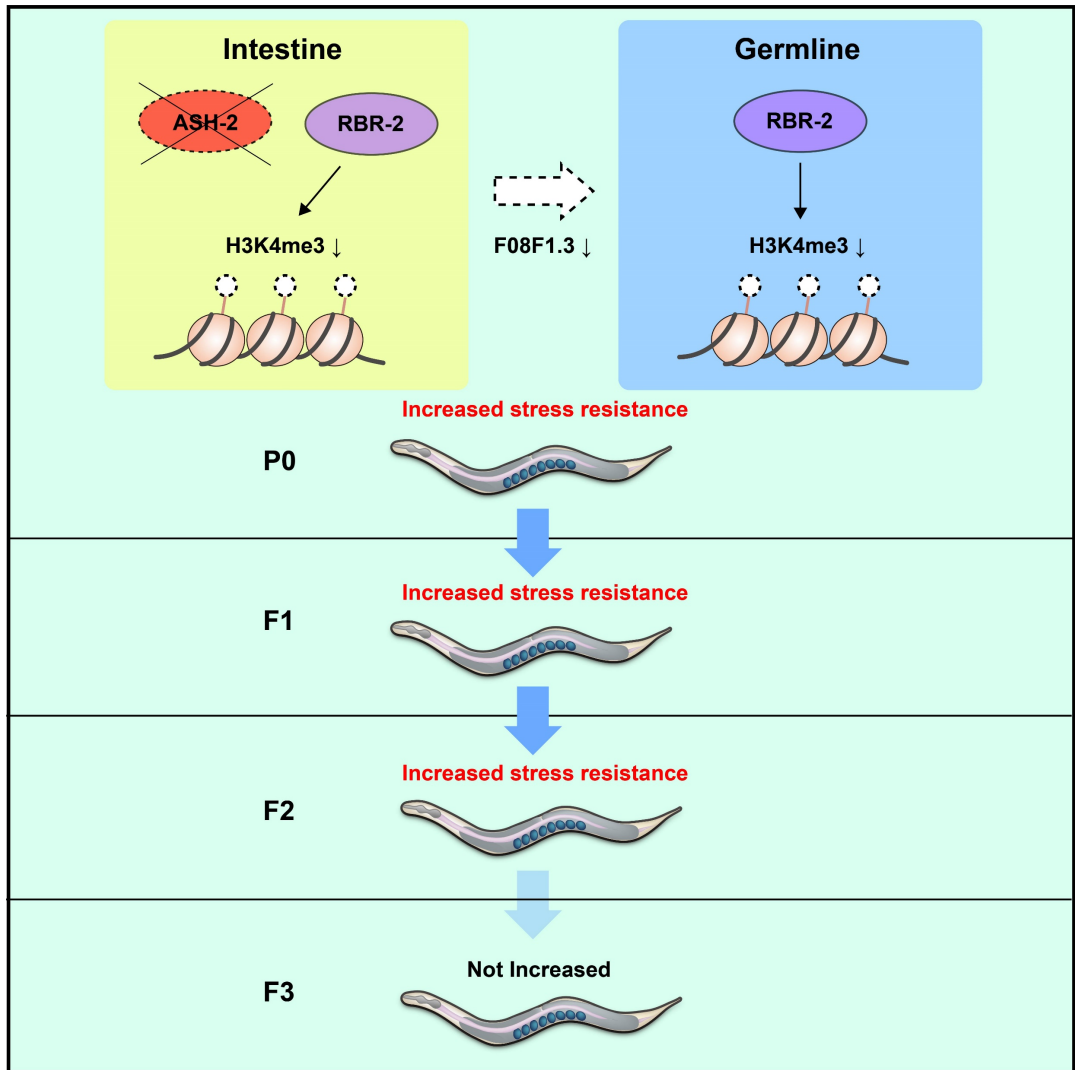


Figure 16 個体の酸化ストレス耐性の上昇および次世代への継承における腸-生殖腺の組織間コミュニケーションのモデル図

エピジェネティック情報の伝達を担う腸-生殖腺の組織間コミュニケーションのモデル図。腸組織で $ash-2$ を欠損すると、腸組織における $F08F1.3$ の発現減少を介して生殖腺へとシグナルが伝達され、生殖腺におけるヒストンH3K4me3レベルが低下する。この組織間コミュニケーションによって個体の酸化ストレス耐性が上昇する。さらに生殖腺におけるエピジェネティック変化が子世代以降に伝わることで、子世代、孫世代においても酸化ストレス耐性が上昇する。

材料・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, NR222: *rde-1(ne219)V; kzIs9[pKK1260(lin26p::nls::gfp); pKK1253(lin-26p::rde-1); rol-6(su1006)]*, NR350: *rde-1(ne219)V;kzIs20[hlh-1p::rde-1; sur-5p::nls::gfp]*, NL2098: *rrf-1(pk1417) I*, TU3401: *sid-1(pk3321)V;uIs69[pCFJ90(myo-2p::mCherry); unc-119p::sid-1]*, VP303: *rde-1(ne219)V;kbIs7[nhx-2p::rde-1; rol-6(su1006)]*, CF1038: *daf-16(mu86)*, EU31: *skn-1(zu135) IV/nT1 [unc-?(n754) let-?](IV;V)*, *ash-2 (tm1905)*, YY538: *hrde-1(tm1200)*, *kyEx1701[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); dpy-30p::Cas9; U6p::ash-2-sgRNA]*, *kyEx1702[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); gly-19p::Cas9; U6p::ash-2-sgRNA]*, *rrf-1(pk1417);kyEx1703[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); gly-19p::Cas9; U6p::ash-2-sgRNA]*, *kyEx1704[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); gly-19p::Cas9; U6p::F08F1.3-sgRNA]*, *rrf-1(pk1417);kyEx1705[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); gly-19p::Cas9; U6p::F08F1.3-sgRNA]*, *rrf-1(pk1417);kyEx1706[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); gly-19p::Cas9; U6p::rbr-2-sgRNA]*, *rrf-1(pk1417);kyEx1707[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); dpy-30p::Cas9; U6p::rbr-2-sgRNA]*, *rbr-2(tm1231);kyEx1708[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); rbr-2p::gfp; gly-19p::Cas9; U6p::ash-2-sgRNA]*, *rbr-2(tm1231);kyEx1709[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); rbr-2p::rbr-2::gfp; gly-19p::Cas9; U6p::ash-2-sgRNA]*, *rbr-2(tm1231);kyEx1710[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); rbr-2p::gfp]*, *rbr-2(tm1231);kyEx1711[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); rbr-2p::rbr-2::gfp]*, *rde-1(ne219)V;kbIs7[nhx-2p::rde-1; rol-6(su1006)]; kyEx1712[pCFJ90 (myo-*

2p::mCherry); *F08F1.3p::F08F1.3*], *kyEx1713[pCFJ90 (myo-2p::mCherry);*
F08F1.3p::F08F1.3::gfp], *hrde-1(tm1200):kyEx1712[pCFJ90 (myo-2p::mCherry);*
gly-19p::Cas9; *U6p::ash-2-sgRNA]*, *otls45[unc-119p::gfp]*, *otls45[unc-*
119p::gfp];kyEx1713[pCFJ90 (myo-2p::mCherry); gly-19p::Cas9; U6p::ash-2-sgRNA]

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)。

トランスジェニック線虫の作成

組織特異的ノックアウト変異体は、50 ng/μl の Cas9 プラスミドと sgRNA プラスミド、マーカー遺伝子として 5 ng/μl の *myo-2p::mCherry* をマイクロインジェクションして作製した。CRISPR-Cas9 ベクターは Addgene のものを使用し (#47549)(Dickinson et al., 2013)、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 (Shen et al., 2014)。sgRNA の標的配列は CRISPR guide RNA selection tool (<http://genome.sfu.ca/crispr/>) を用いて設計した。各遺伝子に対する標的配列を以下に示す。

ash-2 sgRNA: 5' CTCCAACCACTGTCTGCTAC 3'

F08F1.3 sgRNA: 5' AGAGCTTCTTCCATTCCGAC 3'

rbr-2 sgRNA: 5' TCTTCTGTCGGGTAGTAAAT 3'

体細胞組織における *rbr-2* のレスキュー実験では、*rbr-2* 変異体 (*tm1231*) に、2.3 kb の *rbr-2* プロモーターを用いて、全長 *rbr-2* cDNA::*gfp* の融合遺伝子を発現させた。コントロールとして *rbr-2* プロモーター制御下で GFP を発現させた変異体も作製した。線虫の生殖細胞では繰り返し配列に対する強い発現抑制の仕組みが存在するため、生殖

細胞では外来遺伝子は発現抑制されると考えられる(Kelly and Fire, 1998; Kelly et al., 1997; Seydoux and Strome, 1999)。腸特異的に *F08F1.3* を過剰発現させた変異体は、2 kb の *ges-1* プロモーター制御下で全長の *F08F1.3* cDNA を発現させた。*F08F1.3::gfp* の融合遺伝子を発現させた変異体は、2042 bp の *F08F1.3* プロモーター制御下で、全長 *F08F1.3* cDNA::*gfp* の融合遺伝子を発現させた。

コンストラクトの作製

rbr-2p::rbr-2::gfp および *rbr-2p::gfp* 融合遺伝子を pPD95.75 ベクターに組み込んだコンストラクトの作製については、GENEWIZ のカスタムクローニングサービスを利用した。*ges-1p::F08F1.3* 発現コンストラクトについては、PCR で増幅した *F08F1.3* cDNA を制限酵素 KpnI と EcoRI を用いて pPD95.75 ベクターに挿入した後、PCR で増幅した *ges-1* プロモーターの DNA 断片を制限酵素 BamHI と KpnI を用いて挿入した。*F08F1.3p::F08F1.3::gfp* 発現コンストラクトは、PCR で増幅した *F08F1.3* プロモーターの DNA 断片を制限酵素 HindIII と BamHI を用いて pPD95.75 ベクターに挿入した後、PCR で増幅した *F08F1.3* cDNA を制限酵素 BamHI と KpnI を用いて挿入した。各コンストラクト作製に用いたプライマーを以下に示す。

F08F1.3 cDNA Fw: 5'-AATTGGTACCATGCGTTTTGTATACATCTT-3'

F08F1.3 cDNA Rv: 5'- AATTGAATTCTCAGACGACTTGCTCATACG-3'

ges-1 promoter, Fw: 5'-AATTGGATCCAAACTCCGAACTATGATGAC-3

ges-1 promoter, Rv: 5'-AATTGGTACCCTGAATTCAAAGATAAGATA-3'

F08F1.3 promoter, Fw: 5'-AATTAAGCTTGTGCATATTTAGAGCCTGCA-3'

F08F1.3 promoter, Rv: 5'-AATTGGATCCTTGTCAATGATTTTCAGACC-3'

F08F1.3 cDNA, Fw: 5'- AATTGGATCCATGCGTTTTGTATACATCTT-3'

F08F1.3 cDNA, Rv: 5'- AATTGGTACCGGGACGACTTGCTCATACGGCG-3'

ノックアウト変異体の変異導入の確認

CRISPR-Cas9 を用いた変異導入については、T7 エンドヌクレアーゼ I (T7E1)アッセイを行った(Shao et al., 2016; Shen et al., 2014)。各ノックアウト変異体の虫を、10 μ l の lysis buffer (50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.005 % gelatin, 10 mM Tris-HCl pH 8.2, 0.45 % Tween-20, and 60 μ g/ml Proteinase K) に入れ、60°Cで1時間、95°Cで15分インキュベートした。このゲノム DNA をテンプレートにして、ノックアウトの標的領域を含む DNA 断片を PCR で増幅し、T7 エンドヌクレアーゼ I(NEB, #M0302)で切断し、2 %アガロースゲルで電気泳動した。非相同末端結合修復によって生じた挿入や欠失を二重鎖切断により検出することでノックアウトを確認した。

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(*daf-16*, *ash-2;daf-16*, *rbr-2*, *dod-23*, *F08F1.3*, *ttr-46* and *ash-2;rbr-2*) は以下のプライマーを用いて作製した。

daf-16 Fw, 5'-AGAATGAAGGAGCCGGAAAG-3'

daf-16 Rv, 5'-AATTGAGCTCACTGTTCAACTCGTGGTATG-3'

ash-2;daf-16 (ash-2) Fw, 5'-AATTGGATCCATGAGAAGCTCAAAAGGAGG-3'

ash-2;daf-16 (ash-2) RV, 5'-AATTCTCGAGTCGTGTAGTGGTCCTAGAAG-3'

rbr-2 Fw, 5'-AATTGGATCCCTCTCCGAACGCGATGATTT-3'

rbr-2 Rv, 5'-AATTCTCGAGGAAGTTGGAGAGTCCGCATG-3'

dod-23 Fw, 5'-AATTGAGCTCATGTCTCTTGTCTGGAAAGT-3'

dod-23 Rv, 5'-AATTGGATCCAGTCGTCAAACGATACCATC-3'

F08F1.3 Fw, 5'-AATTGAGCTCATGCGTTTTGTATACATCTT-3'

F08F1.3 Rv, 5'-AATTGGATCCGTCGATGAGAAGTGGAGACC-3'

ttr-46 Fw, 5'-AATTGAGCTCATGAACAAGTTGTTCGTCTT-3'

ttr-46 Rv, 5'-AATTGGATCCCTTGCGAGCACCTGGCTTGA-3'

ash-2;rbr-2 (rbr-2) Fw, 5'-AATTGAGCTCCTCTCCGAACGCGATGATTT-3'

ash-2;rbr-2 (rbr-2) Rv, 5'-AATTGGATCCCCTGATTTCCGTTTATTAGC-3'

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 μ l (3 mM) を 60 穴プレートに添加したものを用意し、Young Adult になった線虫を 1 条件につき 40~50 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。2 群間の生存率の有意差検定は Online Application for the Survival Analysis (OASIS) (Yang et al., 2011)を用いて log-rank test を行った。

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、ABI 7300 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。

ウエスタンブロッティング

M9 バッファーで回収した Young Adult の線虫から、標準的な bleach 法を用いて egg を回収し、液体窒素で凍結したのち、sample buffer (2 % SDS, 10% glycerol, 5% β -

mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH6.8, 0.001% Bromophenol blue)を用いて溶解した。次いでソニケーションをした後、上清を回収して 10 分間熱処理を行った。サンプルは SDS-PAGE 法(14% polyacrylamide gel)を用いて展開し、一次抗体として anti-Histone H3 (Abcam ab1791, 1:1000)および anti-Histone H3K4me3 (Abcam ab8580, 1:1000)、二次抗体に anti-rabbit IgG HRP-conjugated (GE Healthcare NA9340, 1:10000)を用いてウエスタンブロッティングを行った。シグナルの検出には Western Lightning Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence reagent (PerkinElmer)を使用し、Image J software を用いて定量化した。

マイクロアレイ

N2 および各組織特異的ノックダウンの変異体に対して、同期してから 3 日間 Control RNAi および *ash-2* RNAi を行い、M9 バッファーで回収した。それぞれの線虫から total RNA を抽出したのち、the Ambion[®] WT cDNA Expression Kit を用いて同社のプロトコールに従いサンプルを調製し、GeneChip[®] *C. elegans* Gene 1.0 ST Array (Affymetrix)にハイブリダイゼーションさせた。アレイのスキャンには GeneChip Scanner 3000 system を使用し、Affimetrix Genechip Command Console (AGCC)を用いてスキャンした画像を処理した。これらは Gene Spring GX 11.02 (Agilent Technologies)のソフトウェア上で解析を行った。

統計解析

スチューデントの t 検定は、Excel(Microsoft)を用いて行った。log-rank test は、Online Application for the Survival Analysis (OASIS) (Yang et al., 2011)を用いた。P値が 0.05 未満を統計的に有意とみなした。

文献

Alvares, S., Mayberry, G., Joyner, E., Lakowski, B., and Ahmed, S. (2014). H3K4 demethylase activities repress proliferative and postmitotic aging. *Aging Cell* *13*, 245–253.

Ashe, A., Sapetschnig, A., Weick, E.-M., Mitchell, J., Bagijn, M.P., Cording, A.C., Doebley, A.-L., Goldstein, L.D., Lehrbach, N.J., Pen, J. Le, et al. (2012). piRNAs Can Trigger a Multigenerational Epigenetic Memory in the Germline of *C. elegans*. *Cell* *150*, 88–99.

Benayoun, B. A., Pollina, E. A., & Brunet, A. (2015). Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 593–610.

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

Buckley, B., Burkhart, K., Gu, S., 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.

Cortessis, V. K., Thomas, D. C., Levine, A. J., Breton, C. V., Mack, T. M., Siegmund, K. D., Haile, R.W., and Laird, P. W. (2012). Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure–response relationships. *Hum. Genet.* *131*, 1565–1589.

Devanapally, S., Ravikumar, S., and Jose, A. (2015). Double-stranded RNA made in *C. elegans* neurons can enter the germline and cause transgenerational gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 2133–2138.

Dias, B. G., & Ressler, K. J. (2014). Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat. Neurosci.* *17*, 89–96.

Dickinson, D., Ward, J., Reiner, D., and Goldstein, B. (2013). Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat. Methods* *10*, 1028–1034.

Espelt, M. V., Estevez, A. Y., Yin, X., and Strange, K. (2005). Oscillatory Ca²⁺ Signaling in the Isolated *Caenorhabditis elegans* Intestine Role of the Inositol-1,4,5-trisphosphate Receptor and Phospholipases C β and γ . *J. Gen. Physiology* *126*, 379–392.

Etchegaray, J. P., & Mostoslavsky, R. (2016). Interplay between metabolism and epigenetics: a nuclear adaptation to environmental changes. *Mol. Cell* *62*, 695–711.

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

Greer, E. L., Maures, T. J., Hauswirth, A. G., Green, E. M., Leeman, D. S., Maro, G. S., Han, S., Banko, M.R., Gozani, O., and Brunet, A. (2010). Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature* *466*, 383–387.

Greer, E. L., Maures, T. J., Ucar, D., Hauswirth, A. G., Mancini, E., Lim, J. P., Benayoun, B.A., Shi, Y., and Brunet, A. (2011). Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *479*, 365–371.

Gu, S. G., Pak, J., Guang, S., Maniar, J. M., Kennedy, S., and Fire, A. (2012). Amplification of siRNA in *Caenorhabditis elegans* generates a transgenerational sequence-targeted histone H3 lysine 9 methylation footprint. *Nat. Genet.* *44*, 157–164.

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

Herranz, D., Muñoz-Martin, M., Cañamero, M., Mulero, F., Martinez-Pastor, B., Fernandez-Capetillo, O., and Serrano, M. (2010). Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat. Commun.* *1*, 3.

Ikeda, T., Uno, M., Honjoh, S., and Nishida, E. (2017). The MYST family histone acetyltransferase complex regulates stress resistance and longevity through transcriptional control of DAF-16/FOXO transcription factors. *EMBO Rep.* *18*, 1716–1726.

Jin, C., Li, J., Green, C.D., Yu, X., Tang, X., Han, D., Xian, B., Wang, D., Huang, X., Cao, X., et al. (2011). Histone Demethylase UTX-1 Regulates *C. elegans* Life Span by Targeting the Insulin/IGF-1 Signaling Pathway. *Cell Metab.* *14*, 161–172.

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., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A., and Ahringer, J. (2000). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* *2*, research0002.1.

Kanfi, Y., Naiman, S., Amir, G., Peshti, V., Zinman, G., Nahum, L., Bar-Joseph, Z., and Cohen, H. (2012). The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature* *483*, 218–221.

Kelly, W. G., and Fire, A. (1998). Chromatin silencing and the maintenance of a functional germline in *Caenorhabditis elegans*. *Development* *125*, 2451-2456.

Kelly, W. G., Xu, S., Montgomery, M. K., and Fire, A. (1997). Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene. *Genetics* *146*, 227-238.

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., and Hansen, M. (2012). *C. elegans* rrf-1 mutations maintain RNAi efficiency in the soma in addition to the germline. *PLoS ONE* 7, e35428.
- Li, T., and Kelly, W. G. (2011). A role for Set1/MLL-related components in epigenetic regulation of the *Caenorhabditis elegans* germ line. *PLoS Genet.* 7, e1001349.
- López-Otín, C., Blasco, M., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–217.
- Luteijn, M. J., Van Bergeijk, P., Kaaij, L. J., Almeida, M. V., Roovers, E. F., Berezikov, E., and Ketting, R. F. (2012). Extremely stable Piwi-induced gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 31, 3422-3430.
- 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.
- Moore, R., Kaletsky, R., and Murphy, C. (2019). Piwi/PRG-1 Argonaute and TGF- β Mediate Transgenerational Learned Pathogenic Avoidance. *Cell* 177, 1827–1841.e12.
- Ni, J., Kalinava, N., Chen, E., Huang, A., Trinh, T., and Gu, S. (2016). A transgenerational role of the germline nuclear RNAi pathway in repressing heat stress-induced transcriptional activation in *C. elegans*. *Epigenetics Chromatin* 9, 3.
- 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.
- Qadota, H., Inoue, M., Hikita, T., Köppen, M., Hardin, J., Amano, M., Moerman, D., and Kaibuchi, K. (2007). Establishment of a tissue-specific RNAi system in *C. elegans*. *Gene* 400, 166–173.

- Rechavi, O., Houri-Ze'evi, L., Anava, S., Goh, W., Kerk, S., Hannon, G., and Hobert, O. (2014). Starvation-Induced Transgenerational Inheritance of Small RNAs in *C. elegans*. *Cell* *158*, 277–287.
- Riedel, C. G., Downen, R. H., Lourenco, G. F., Kirienko, N. V., Heimbucher, T., West, J. A., Bowman, S. K., Kingston, R.E., Dillin, A., Asara, J. M., and Ruvkun, G. (2013). DAF-16 employs the chromatin remodeller SWI/SNF to promote stress resistance and longevity. *Nat. Cell Biol.* *15*, 491–501.
- Riera, C. E., Merkwirth, C., De Magalhaes Filho, C. D., and Dillin, A. (2016). Signaling networks determining life span. *Annu. Rev. Biochem.* *85*, 35-64.
- Seydoux, G., and Strome, S. (1999). Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells. *Development* *126*, 3275-3283.
- Shao, L.-W., Niu, R., and Liu, Y. (2016). Neuropeptide signals cell non-autonomous mitochondrial unfolded protein response. *Cell Res.* *26*, 1182–1196.
- 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.
- Siebold, A., Banerjee, R., Tie, F., Kiss, D., Moskowitz, J., and Harte, P. (2010). Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 169–174.
- Someya, S., Yu, W., Hallows, W., Xu, J., Vann, J., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Denu, J., and Prolla, T. (2010). Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss under Caloric Restriction. *Cell* *143*, 802–812.
- Spracklin, G., Fields, B., Wan, G., Vijayendran, D., Wallig, A., Shukla, A., and Kennedy, S. (2017). The RNAi Inheritance Machinery of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *206*, 1403-1416.
- Su, L., Li, H., Huang, C., Zhao, T., Zhang, Y., Ba, X., Li, Z., Zhang, Y., Huang, B., Lu, J., et al. (2018). Muscle-Specific Histone H3K36 Dimethyltransferase SET-18 Shortens

Lifespan of *Caenorhabditis elegans* by Repressing *daf-16a* Expression. *Cell Rep.* 22, 2716–2729.

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.

Turner, B. M. (2009). Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* 364, 3403–3418.

Vaiserman, A., Koliada, A., and Jirtle, R. (2017). Non-genomic transmission of longevity between generations: potential mechanisms and evidence across species. *Epigenetics Chromatin* 10, 38.

Van Oosten-Hawle, P., Porter, R.S., and Morimoto, R.I. (2013). Regulation of Organismal Proteostasis by Transcellular Chaperone Signaling. *Cell* 153, 1366–1378.

Wenzel, D., Palladino, F., and Jedrusik-Bode, M. (2011). Epigenetics in *C. elegans*: Facts and challenges. *Genesis* 49, 647–661.

Woodhouse, R. M., Buchmann, G., Hoe, M., Harney, D. J., Low, J. 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.

Xiao, Y., Bedet, C., Robert, V., Simonet, T., Dunkelbarger, S., Rakotomalala, C., Soete, G., Korswagen, H., Strome, S., and Palladino, F. (2011). *Caenorhabditis elegans* chromatin-associated proteins SET-2 and ASH-2 are differentially required for histone H3 Lys 4 methylation in embryos and adult germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 8305–8310.

Yang, J.-S., Nam, H.-J., Seo, M., Han, S., Choi, Y., Nam, H., Lee, S.-J., and Kim, S. (2011). OASIS: Online Application for the Survival Analysis of Lifespan Assays Performed in Aging Research. *PLoS ONE* 6, e23525.

謝辞

本研究を進めるにあたり、修士時代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、佐藤・カールトン綾博士、Peter Mark Carlton 准教授に感謝いたします。また修士課程の頃より、副指導教員として折に触れてご助言頂きました、米原教授と松本教授に感謝の意を表します。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や生命科学研究科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。

Masanori Nono, Saya Kishimoto, Aya Sato-Carlton, Peter Mark Carlton, Eisuke Nishida, and Masaharu Uno

Intestine-to-Germline Transmission of Epigenetic Information Intergenerationally Ensures Systemic Stress Resistance in *C. elegans*

Cell Reports, Volume 30, Issue 10, Pages 3207-3217, March 10, 2020