

成長期の栄養環境が
寿命を短縮する機構の研究

水谷 祥子

目次

論文要旨	5
略語表	7
出芽酵母変異株の表記	7
第 1 章 序論	8
1.1. 成長期の栄養環境（栄養履歴）は成体に長期的な影響を及ぼす	8
1.2. ショウジョウバエとその餌である出芽酵母	9
1.2.1. 研究モデルとしてのショウジョウバエの有用性	9
1.2.2. 出芽酵母の単一遺伝子ノックアウト株を栄養履歴として用いる	9
1.3. 本研究の概要	11
第 2 章 結果	13
2.1. 幼虫期の酵母餌 <i>nat3Δ</i> は成虫の寿命を短縮する	13
2.1.1. 幼虫に酵母の単一遺伝子ノックアウト株を餌として与える実験系：live yeast-fly assay	13
2.1.2. 寿命に影響する酵母変異株餌の探索	13
2.2. <i>nat3Δ</i> 餌は幼虫の Gcn5 機能を低下させる	15
2.2.1. <i>nat3Δ</i> 餌を食べた幼虫の遺伝子発現変動は、ヒストンアセチル基転移酵素で ある Gcn5 の変異体の遺伝子発現変動に似ている	15
2.2.2. <i>nat3Δ</i> 餌を食べた幼虫では Gcn5 機能が低下している	16
2.3. 幼虫期における Gcn5 機能の低下は寿命を短縮させる	18
2.3.1. 幼虫期特異的に Gcn5 をノックダウンすると寿命が短縮する	18
2.3.2. 鍵となる組織のひとつは神経系である	18
2.3.3. さらなる死因の追究	19
2.4. 短命の原因栄養素はオレイン酸・バリン・酢酸（OVA）である	22
2.4.1. <i>nat3Δ</i> 餌では長鎖脂肪酸と分岐鎖アミノ酸が増加している	22
2.4.2. 脂肪酸添加実験系の検討	22

2.4.3.	長鎖脂肪酸（オレイン酸）と分岐鎖アミノ酸（バリン）と短鎖脂肪酸（酢酸）の増量で寿命が短縮する	23
2.4.4.	酢酸は <i>nat3Δ</i> 餌で増加していない	24
2.5.	OVA 餌を食べた幼虫と <i>nat3Δ</i> 餌を食べた幼虫の応答は似ている	25
2.5.1.	遺伝子発現プロファイル上の類似性	25
2.5.2.	OVA 餌は幼虫内のヒストンアセチル化を低下させる	25
2.6.	幼虫内の Gcn5 機能減弱の原因はアセチル CoA 相対レベルの低下ではないか	27
2.6.1.	<i>nat3Δ</i> 餌を食べた幼虫ではパントテン酸が増加する	27
2.6.2.	<i>nat3Δ</i> 餌を食べた幼虫ではアセチル CoA の相対レベルが低下する	27
2.7.	性差	30
2.7.1.	メス成虫の寿命	30
2.7.2.	メス幼虫の遺伝子発現	30
第 3 章	考察	32
3.1.	本研究の発見と因果関係の追究の試み	32
3.2.	<i>nat3Δ</i> 餌における第三の原因栄養素は何か	33
3.3.	OVA 餌を食べた幼虫でもアセチル CoA 相対レベルが下がるのか	33
3.4.	幼虫の神経細胞における Gcn5 機能低下の可能性と成虫期の死因	35
3.5.	本研究の展望	37
第 4 章	材料と方法	38
4.1.	主な研究ツール	38
4.2.	ショウジョウバエ系統と実験室標準餌	40
4.3.	Live yeast-fly assay	41
4.3.1.	酵母株の培養	41
4.3.2.	ショウジョウバエ胚の無菌化	41
4.3.3.	コントロール酵母餌への添加実験	42
4.3.4.	46 酵母変異株の分離	43
4.4.	幼虫期特異的なノックダウンまたは過剰発現	44
4.5.	寿命アッセイ	44
4.6.	クライミング能テスト	44
4.7.	ショウジョウバエまたは酵母のメタボローム解析	45

4.7.1.	凍結サンプルの調製	45
4.7.2.	メタボローム解析	45
4.8.	体重測定	46
4.9.	RNA-seq 解析	46
4.9.1.	RNA サンプル調製.....	46
4.9.2.	RNA-seq データ解析	47
4.10.	qRT-PCR	48
4.11.	CUT&RUN	48
4.11.1.	DNA サンプル調製.....	48
4.11.2.	CUT&RUN データ解析	50
4.12.	酵母の脂肪酸解析	51
4.12.1.	中鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸および極長鎖脂肪酸.....	51
4.12.2.	酵母細胞内部の短鎖脂肪酸.....	51
4.12.3.	酵母細胞外部の短鎖脂肪酸.....	52
4.13.	幼虫の CoA 関連代謝産物測定	53
4.13.1.	アセチル CoA および CoA	53
4.13.2.	脂肪酸アシル CoA	53
4.14.	統計解析	53
図		55
表		98
引用文献		136
注釈		149
謝辞		150

論文要旨

動物の幼若体は、成体へと劇的な成長を遂げる。成長期の栄養環境（栄養履歴）はこの発生段階を大きく左右する一方、成体の健康状態にも長期的な影響を与えることが知られている。しかし、この長期的影響の分子機構には不明な点が多く残されている。そこで本研究では、①長期的に影響を及ぼす栄養履歴の実体、②その栄養履歴を摂った動物の体内での生体応答、③栄養履歴や生体応答、長期的影響の間の因果関係、以上 3 つの問いを立て、この分子機構の解明を目指した。

そこで、寿命が 3 ヶ月と短く、ヒトと共通したホルモンや器官を持つキイロショウジョウバエ（以下、ショウジョウバエと呼ぶ）と、ショウジョウバエの餌となる出芽酵母（以下、酵母と呼ぶ）に着目した。酵母の各遺伝子をノックアウトした変異株コレクションでは、アミノ酸などの細胞中の成分の量が、株ごとに異なることが報告されていた。したがって、酵母変異株を餌として用いれば、含まれる栄養成分の種類や量が異なる食餌を、先入観なく、かつ効率よく用意できると考えた。ショウジョウバエの幼虫に、酵母変異株それぞれを餌として与えて、異なる栄養履歴を持つ成虫を発生させた。そして、発生した成虫を共通の実験室標準餌で飼育して、寿命を調べた。この探索の結果、酵母 *nat3* 遺伝子の変異株 (*nat3Δ*) が成虫の寿命を短縮させることを見出した。

nat3Δ 餌を食べた幼虫の応答を調べる目的で、遺伝子発現解析とエピゲノム解析を行ったところ、*nat3Δ* 餌により、ヒストンアセチル基転移酵素 Gcn5 の機能が低下することを発見した。そこで、幼虫期の Gcn5 機能の低下が成虫の寿命を短縮させるかを検証するために、幼虫期特異的に Gcn5 遺伝子をノックダウンし、発生した成虫の寿命を調べた。その結果、Gcn5 ノックダウン履歴を持つ成虫の寿命は短縮し、幼虫期の Gcn5 機能の低下が寿命短縮の原因となり得ることがわかった。

次に、栄養履歴における寿命短縮の原因を探った。幼虫の遺伝子発現解析と酵母の代謝産物解析の結果から、長鎖脂肪酸のオレイン酸 (Oleic acid)、分岐鎖アミノ酸のバリン (Valine)、そして短鎖脂肪酸の酢酸 (Acetic acid) に着目した。これら 3 成分をコントロール餌に添加し (OVA 餌)、幼虫に与えたところ、発生した成虫の寿命はコントロールより短縮した。さらに、OVA 餌を食べた幼虫の遺伝子発現解析とエピゲノム解析を行ったところ、Gcn5 機能が低下していることがわかった。ま

た、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫の代謝産物を調べたところ、アセチル基供与体であるアセチル CoA に対して競合的に働く CoA や、長鎖脂肪酸アシル CoA などの CoA 関連代謝産物の量が、コントロールの幼虫よりも増加していた。一方で、アセチル CoA の量は変わらなかった。これらの CoA 関連代謝産物は、長鎖・短鎖脂肪酸や分岐鎖アミノ酸に由来する代謝産物である。以上から、長鎖・短鎖脂肪酸と分岐鎖アミノ酸を過剰に摂取すると、アセチル CoA の競合相手となる代謝産物の量が相対的に増え、その結果 Gcn5 機能が減弱する可能性が示唆された。

このように本研究では、幼虫期でのオレイン酸、バリン、酢酸の 3 成分の過剰摂取が Gcn5 機能を低下させる即応的応答を引き起こし、さらに寿命にまで長期的に作用する機構を明らかにした。本研究で見出した上記の脂肪酸や分岐鎖アミノ酸は、動物が日常的に摂取する栄養素であり、さらに Gcn5 は真核生物を通して保存されているエピジェネティック制御因子である。したがって本研究の発見は、普遍的なメカニズムである可能性が考えられる。

略語表

Gcn5	General control non-repressible 5
KAT	Lysine acetyltransferase
YPD	Yeast extract peptone dextrose
mSCM	Modified synthetic complete medium
KD	Knockdown
GS	GeneSwitch（薬剤依存型転写因子）
CNS	Central nervous system
RNA-seq	RNA-sequencing
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
CE-MS	Capillary electrophoresis-mass spectrometry
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
RT-qPCR	Reverse trascription-quantitative PCR
TPM	Transcripts per kilobase million
GO	Gene ontology
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
CoA	Coenzyme A

出芽酵母変異株の表記

遺伝子名は小文字のアルファベット 3 文字と数字（すべてイタリック体）で表記する（例：*nat3*）。遺伝子欠失株は遺伝子名の後に Δ を付ける（例：*nat3\Delta*）。

第 1 章 序論

1.1. 成長期の栄養環境（栄養履歴）は成体に長期的な影響を及ぼす

動物は成長期に、大規模かつ急速な成長を遂げ、成体へと発生する。成長期に摂る栄養は、この発生段階に大きな影響を及ぼす（Shim et al., 2013；Leulier et al., 2017；Bhutta et al., 2017；Tu et al., 2023）。それだけにとどまらず、成体になった以降も、その個体の健康に長期的に影響することが、近年ヒトの疫学調査や動物実験により報告されている。例えば、母親が妊娠中や授乳期に低栄養状態になる、つまり胎児や乳児も栄養不良状態に陥ると、体重など、そのときの健康状態に影響が出るだけでなく、成人になったときの冠動脈性心疾患や肥満のリスクも悪化し、寿命にも悪影響がある（図 1 と 2；Eriksson et al., 1999；Ozanne & Hales, 2004；Barker & Thornburg, 2013；Kramer, 2023）。このように、栄養も含めた早期の環境因子が長期的な影響を及ぼす考え方は、The Developmental Origins of Health and Disease（DOHaD）仮説と呼ばれる（Hanson & Gluckman, 2014；Langley-Evans, 2015）。

現在、DoHaD 機構は、エピジェネティクスの観点から研究されてきた。食事中に含まれる栄養素は、体内で代謝されると、DNA やヒストン修飾の供与体を生じうる。これらの栄養素の摂取量が変わると、特定の DNA やヒストン修飾が増加または減少し、その修飾変化が保持されることにより、長期的な遺伝子発現の変動につながる。例えば、妊娠中の母親マウスに葉酸、コリン、ビタミン B₁₂、ベタインのメチル供与体物質を添加した餌を与えると、アグーチ遺伝子の対立遺伝子の上流の DNA CpG メチル化が増加し、子孫マウスの毛色が黄色ではなく茶色になる確率が高くなる（Waterland & Jirtle, 2003；Jirtle & Skinner, 2007）。

しかしながら、栄養履歴中の原因栄養素を解明した研究は、これら以外にはほとんどなく、メチル供与体物質以外の栄養素が関与しているかは不明である。また、個体の応答を網羅的に調べた研究も少なく、栄養履歴と生体応答の因果関係についての知見も不足している。そこで本研究では、①栄養履歴において、どの栄養素の増減が長期的影響を引き起こすのか、②栄養履歴に対して個体はどのように応答するのか、③それらの栄養素と個体の応答が長期的影響の原因であるのか、以上 3 つの問いを立て、この機構を解き明かそうと考えた。

1.2. ショウジョウバエとその餌である出芽酵母

1.2.1. 研究モデルとしてのショウジョウバエの有用性

上記の問題を解くにあたり、モデル生物であるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*; 以降、ショウジョウバエと呼ぶ) に着目した。ショウジョウバエは、胚発生後孵化し、2 回の脱皮を経て最終齢の 3 齢幼虫へと発生し、この間、身体の容積はおよそ 200 倍になる (図 3A)。変態を経て成虫へと羽化した後はおよそ 3 ヶ月しか生きず、哺乳類に比べてその寿命ははるかに短い。また、ショウジョウバエとヒトの間では、インスリンを含むホルモンやその応答システム、そして腸などの器官と、その生理学的な役割が高く保存されている (図 3B と 3C; Droujinine & Perrimon, 2016)。このような特徴を持つショウジョウバエは、これまでに、栄養依存的な成長や病態、寿命機構の理解に大きな貢献を果たしてきた (Hirabayashi et al., 2013; Piper & Partridge, 2018; Watanabe et al., 2019)。

1.2.2. 出芽酵母の単一遺伝子ノックアウト株を栄養履歴として用いる

ショウジョウバエの実験室餌には、主要な材料として、乾燥させた出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*; 以降、酵母と呼ぶ) が含まれることが一般的である。酵母は、ステロールなど、幼虫の発生にとって不可欠な栄養素を供給する (Bos et al., 1976)。ショウジョウバエと酵母の組み合わせは、栄養履歴の研究にも大きく貢献してきた。例えば、餌中の酵母量を制限して幼虫に与えると、オスの成虫の寿命が延びること (Stefana et al., 2017) や、別の研究では、メスの成虫の寿命に影響はないものの、産卵能が低下することや (Tu & Tatar, 2003)、また、餌に含まれる酵母が生きている状態なのか、乾燥状態なのか、熱処理された状態なのかによっても、オスの成虫の寿命や、食の嗜好性が変わること (Grangeteau et al., 2018) が報告されている。近年は、酵母に含まれる栄養成分を参考にした、ショウジョウバエ用の完全合成培地が開発されており (Piper et al., 2014; Piper et al., 2017; Sorge et al., 2025)、ショウジョウバエの示す表現型を栄養素レベルで解析しようとする動きが高まっている。しかしながら、これらの完全合成培地上では幼虫の発生遅延が見られ、完全合成培地中の栄養素の種類とその量の最適化が不十分であると考えられる。したがって、本研究においては、完全合成培地ではない手法で栄養履歴の解析を行うことに

した。

そこで我々は、ショウジョウバエ幼虫や線虫に、細菌の単一遺伝子ノックアウト株を餌として与え、その餌が遺伝子発現や代謝、発生にどのような影響を及ぼすかを解明した先行研究（Shin et al., 2011；Watson et al., 2014）に着想を得て、同様に、酵母の各遺伝子をノックアウトした変異株コレクションを幼虫の餌として用いることにした。このコレクションの酵母変異株間では、含まれるアミノ酸の量に差があることが知られており（Mülleder et al., 2016）、アミノ酸以外の栄養素についても株ごとに異なる可能性が十分予想される。したがって、酵母変異株コレクションを用いることにより、多様な栄養履歴を先入観なく用意できると考えた。

1.3. 本研究の概要

本研究では、幼虫期の餌が成虫の寿命に長期的な影響を与える機構を解明するために、①幼虫期の餌において、どの栄養素の増減が長期的影響を引き起こすのか、②その餌を食べた幼虫ではどのような応答が起きるのか、③それらの栄養素と幼虫の応答と寿命の表現型に因果関係はあるのか、以上 3 つの問いを立てた（図 4）。

幼虫期の餌として、出芽酵母の単一遺伝子ノックアウト株を用いることにした。全 5,153 株の中から、すでに当研究室では、幼虫から蛹までの発生に影響する酵母変異株を 46 株分離していた。そこで、これら 46 株の中から、成虫の寿命を変える酵母変異株餌を探索した。段階的な探索を経て、成虫の寿命を短縮させる酵母変異株である *nat3Δ* を分離した。

次に、幼虫の遺伝子発現解析とエピゲノム解析を行い、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫において、ヒストンアセチル基転移酵素 Gcn5 の機能が低下していることを見出した。この結果を受け、幼虫期の Gcn5 機能の低下が寿命短縮の原因であると仮説を立てた。これを検証するために、幼虫期特異的に Gcn5 遺伝子をノックダウンし、発生した成虫の寿命を調べた。その結果、Gcn5 ノックダウン履歴を負った成虫は、Gcn5 ノックダウン履歴を持たない成虫より短命になり、幼虫期の Gcn5 機能の低下が寿命短縮の原因であることがわかった。さらに幼虫期における応答の詳細を探るために、幼虫のどの組織における Gcn5 の機能が特に重要かを調べた。幼虫の特定の組織特異的に Gcn5 をノックダウンしたところ、神経細胞特異的に Gcn5 をノックダウンしたとき成虫の寿命が短縮した。この結果から、幼虫の神経細胞における Gcn5 の機能が、将来の正常寿命に必要であることが示唆された。続いて、幼虫の中樞神経を用いた遺伝子発現解析を行い、幼虫の神経細胞における短命の原因の特定に迫った。

栄養履歴における寿命短縮の原因については、幼虫の遺伝子発現解析と酵母の代謝産物解析の結果から、オレイン酸 (Oleic acid)、バリン (Valine)、酢酸 (Acetic acid) の 3 成分 (OVA) に着目した。OVA をコントロール餌に添加し、幼虫に与えたところ、発生した成虫の寿命はコントロールより短縮した。次に、OVA 餌を食べた幼虫においても、Gcn5 機能が低下しているか検証するため、遺伝

子発現解析とエピゲノム解析を行った。その結果、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫と類似した遺伝子発現変動プロファイルとエピゲノムプロファイルが見られ、OVA 餌を食べた幼虫においても Gcn5 機能が低下していることが示された。では、幼虫において Gcn5 機能の低下を招く原因は何か。幼虫の代謝産物変動の解析結果から、CoA や長鎖アシル CoA などの CoA 関連代謝産物に対して、アセチル CoA レベルが相対的に低下するためであることが示唆された。最後に、栄養履歴に対する応答の性差についても解析した。

本研究では、網羅的解析を通して、オレイン酸、バリン、そして酢酸が豊富に含まれる栄養履歴が、幼虫の Gcn5 機能を低下させ、かつ成虫の寿命を短縮させることを明らかにし、これらの間に因果関係あるいは強い相関関係があることを示した。

第 2 章 結果

2.1. 幼虫期の酵母餌 *nat3Δ* は成虫の寿命を短縮する

2.1.1. 幼虫に酵母の単一遺伝子ノックアウト株を餌として与える実験系：live yeast-fly assay

寿命に影響する栄養履歴を探るために、幼虫期に、コントロール酵母株または酵母の単一遺伝子ノックアウト株それぞれを餌として与え (live yeast-fly assay)、成虫期には共通して実験室標準餌を与える実験系を考案した (図 5)。Live yeast-fly assay では、幼虫は無菌化された胚から孵化した後、培地である mSCM (酵母用 synthetic complete medium の改変版) と、その培地上で増殖する酵母の両方を食べながら発生する。生きた酵母を含まない場合は、幼虫は蛹に発生できないことから、酵母株がそれぞれ提供する栄養素バランスが幼虫の発生に大きな影響を及ぼすと考えられる。これらの酵母株は防腐剤 (4.2.) を含む実験室標準餌の上では増殖できなかったため (図 6A)、成虫期にこれらの酵母が及ぼす影響は、幼虫期に比べて非常に小さいと考えられる。すでに当研究室では、酵母変異株コレクション全 5,153 株それぞれを餌として幼虫に与え、蛹への発生時期や発生率を変化させる酵母変異株 46 株を見つけ出しており (表 1; 高橋、2017)、この 46 株を出発点に探索を開始した (図 5C)。

この探索の前に、live yeast-fly assay の特徴を探るため、実験室標準餌との比較、あるいは酵母量を増減させた実験を行った。実験室標準餌と比べて、コントロール酵母餌では幼虫から成虫の発生は大きく低下したものの、オスの成虫の寿命は大きく変わらなかった (図 6B と 6C)。一方、酵母量の増減は、成虫までの発生にもオスの寿命にも目立った影響を示さなかった (図 6D と 6E)。以降に示す、幼虫から成虫までの発生データと 2.7. のデータを除く、データには全てオスが用いられている。

2.1.2. 寿命に影響する酵母変異株餌の探索

寿命に影響する酵母変異株餌を探索するために、まず、前述の 46 株を幼虫に与えて、寿命アッセイに十分な数の成虫が発生するかを調べた。その結果、29 株

では寿命アッセイに足る数の成虫が得られ、残りの 17 株ではほとんど成虫が発生しないことがわかった (図 5C と 7; 表 1)。それら 29 株を用いて、寿命を変える酵母変異株を探索した結果、成虫を短命にした酵母 *nat3* 遺伝子の変異株 (*nat3Δ*) と、長命にした酵母 *brp1* 遺伝子の変異株 (*brp1Δ*) を分離した (図 5C、8 および 9A~9C; 表 1 と 2)。*nat3Δ* 餌を食べた幼虫および *nat3Δ* 栄養履歴を持つ成虫は、短命以外に、体重増加や運動能低下の表現型を示した (図 9D~9F)。

酵母の *nat3* 遺伝子の産物は、タンパク質の N 末端アミノ酸にアセチル基を付加する N-terminal acetyltransferase のひとつ、NatB の触媒サブユニットである (Polevoda et al., 1999)。N 末端アミノ酸のアセチル化の分子機能は、基質タンパク質の分解、局在、他のタンパク質との複合体形成など多様であり (Aksnes et al., 2016)、NatB の基質と報告されているタンパク質も 200 ほど報告されている (Caesar & Blomberg, 2004; Caesar et al., 2006; Helbig et al., 2010; Van Damme et al., 2012; Croft et al., 2018)。また、*nat3Δ* 酵母についても ニコチンアミドジヌクレオチド代謝の変化など、多様な表現型が知られている (Wilson et al., 2002; Caesar et al., 2006; Croft et al., 2018; Sugaya et al., 2023)。mSCM 上での *nat3Δ* 酵母の増殖はコントロール酵母株と大きく変わらなかった (図 9G)。

2.2. *nat3Δ* 餌は幼虫の Gcn5 機能を低下させる

2.2.1. *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の遺伝子発現変動は、ヒストンアセチル基転移酵素である Gcn5 の変異体の遺伝子発現変動に似ている

我々は、*nat3Δ* 餌が幼虫期に何らかの損傷を引き起こし、成虫期においてもその損傷から回復できないため、寿命が短縮するのではないかと考えた。この仮説を検証するために、我々は酵母餌の代謝産物解析、およびショウジョウバエ幼虫全身または成虫全身を用いた、遺伝子発現解析および代謝産物解析を行った（図 10A ; 表 3~5）。ショウジョウバエの遺伝子発現解析において、コントロールと *nat3Δ* 餌を食べた幼虫（後期 3 齢）の間で有意に変動した遺伝子は 1,120 であった一方、それぞれの栄養履歴を持った若齢成虫（1 週齢）または中齢成虫（5 週齢）では 200 ほどにとどまった。この結果は、遺伝子発現上では *nat3Δ* 餌の影響が餌を食べた直後の方が大きく現れることを示唆している。そこで、まず幼虫の遺伝子発現解析データに着目したところ、ふたつの特徴を発見した。ひとつは *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の遺伝子発現変動が、ヒストンアセチル基転移酵素遺伝子の変異体の遺伝子発現変動に類似していたこと、そしてもうひとつは特定の代謝経路の酵素遺伝子の発現が *nat3Δ* 餌を食べた幼虫で上がっていたことである。後者の発見については 2.4. で述べる。

General control non-repressible 5 (Gcn5) は代表的なヒストンタンパク質の N 末端テールのリジン残基をアセチル化する酵素（ヒストンアセチル基転移酵素）のひとつであり、ヒストンテールがアセチル化されると正電荷が減少し、クロマチン構造が緩むことで、転写因子や転写活性化因子が DNA に結合しやすくなる

(Brownell et al., 1996 ; Kuo et al., 1996 ; Verdin & Ott, 2015)。ショウジョウバエでは Gcn5 は 4 種類の複合体を形成し、そのひとつ ATAC は酵母からヒトまで保存されている複合体であり、特異的なサブユニット Ada2a がその複合体形成を担うこと、そして Gcn5 だけでなく Ada2a もヒストンアセチル化に必要であることが知られている (Carré et al., 2005 ; Ciurciu et al., 2006 ; Torres-Zelada & Weake, 2021 ; Dent, 2024)。また、ATAC はショウジョウバエの蛹化ホルモンであるエクダイソンの生合成経路の遺伝子発現を制御することが報告されており (Pankotai et al., 2010 ; Niwa & Niwa, 2016)、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫ではこの遺伝子群の発現が変動していた（図

10B)。そこで、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫の遺伝子発現プロファイルと *Gcn5* ヌル変異体と *Ada2a* ヌル変異体の遺伝子発現プロファイル (Carré et al., 2008) を比較することにした。まず、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫とコントロール酵母餌を食べた幼虫の間の遺伝子発現変動量と、*Gcn5* 変異体とコントロール遺伝子型の幼虫の間の遺伝子発現変動量をクラスタリング解析すると、*nat3Δ* 餌摂食で発現が上がった遺伝子は *Gcn5* 変異でも発現が上がる傾向が見られ、*nat3Δ* 餌摂食で発現が下がった遺伝子は *Gcn5* 変異でも発現が下がる傾向にあった (図 11A)。また、有意に発現変動した遺伝子同士を比較すると、*nat3Δ* 餌摂食で有意に発現上昇した遺伝子は、*Gcn5* 変異で有意に発現低下した遺伝子との被りよりも、発現上昇した遺伝子との被りが大きく、*nat3Δ* 餌摂食で有意に発現低下した遺伝子についても同様に *Gcn5* 変異で有意に発現低下した遺伝子との被りが大きい偏向性が見られた (図 11B)。*Ada2a* 変異体の遺伝子発現変動との比較においても同様の結果を得た (図 11C と 11D)。一方、ヒストン脱メチル化酵素 4 遺伝子の変異体 (*Kdm4*) の遺伝子発現変動 (Tsurumi et al., 2019) と比較しても、このような偏向性は見られなかった (図 11E と 11F)。これらの結果と、*Gcn5* などのリジンアセチルトランスフェラーゼ (KATs) 遺伝子や *Ada2a* の発現自体は *nat3Δ* 餌摂食による影響を受けなかったことから (図 12)、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫内では、ATAC などの *Gcn5* 複合体の機能が低下しているのではないかと仮説を立てた。

2.2.2. *nat3Δ* 餌を食べた幼虫では *Gcn5* 機能が低下している

上記の仮説を検証するために、CUT&RUN 手法により (Skene & Henikoff, 2017)、*Gcn5* の基質のひとつであるヒストン H3K9 のアセチル化 (H3K9ac) のプロファイルをゲノムワイドに調べた (Carré et al., 2005 ; Feller et al., 2015)。まず、コントロール酵母餌または *nat3Δ* 餌を食べた幼虫全身を用いて、CUT&RUN 解析を行った (図 13A 左と図 13B 上 ; 表 6)。検出された 12,102 の H3K9ac ピークの中で、798 が有意に H3K9ac レベルが変動したピークであり、そのうち H3K9ac レベルが上昇したピークはわずか 13 であり、残りの 786 はいずれも H3K9ac レベルが低下したピークであった (図 13C)。次に、薬剤 RU486 依存的に働く転写因子 GeneSwitch (Osterwalder et al., 2001 ; Roman et al., 2001 ; Tricoire et al., 2009 ;

Yamashita et al., 2021) により、全身で shRNA を発現させ *Gcn5* をノックダウンした幼虫と、非ノックダウン（コントロール）の幼虫において H3K9ac プロファイル調べた（図 13A 右、図 13B 下、および図 14；表 6）。検出された 8,419 ピークの中で、1,233 が有意に H3K9ac レベルが変動したピークであり、そのうち H3K9ac レベルが上昇したピークはわずか 30 であり、残りの 1,230 はいずれも H3K9ac レベルが低下したピークであった（図 13D）。そして、*nat3Δ* 餌摂食による H3K9ac 低下ピークと *Gcn5* ノックダウンによる H3K9ac 低下ピークを比較すると、有意なピークの重複が見られ、さらには、H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子も有意に重複していた（図 15）。以上の結果から、*nat3Δ* 餌摂食が幼虫内の *Gcn5* 機能を低下させることがわかった。

この *nat3Δ* 餌による *Gcn5* 機能の低下は遺伝子発現変動の直接の原因なのだろうか。*nat3Δ* 餌による H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子と、発現変動した遺伝子を比較したところ、その重複は小さかった（図 16A）。同様に、*Gcn5* ノックダウンの場合も比較したが、重複は小さかった（図 16B）。一方、H3K9ac ピークの分布を調べると、発現している遺伝子に多く見られ、さらに、転写開始点（TSS）から下流 500 bp で特に H3K9ac マークが濃縮しており、先行研究で報告されている特徴と一致した（図 16C と 16D；Kharchenko et al., 2011；Yin et al., 2011）。この結果は、*Gcn5* 機能の低下が遺伝子発現変動に与える影響は直接的ではなく、むしろ間接的であることを示唆する。

2.3. 幼虫期における *Gcn5* 機能の低下は寿命を短縮させる

2.3.1. 幼虫期特異的に *Gcn5* をノックダウンすると寿命が短縮する

幼虫期の *Gcn5* 機能の低下は寿命短縮の原因なのだろうか。これを検証するために、RU486 を幼虫期のみに与えることによって *Gcn5* ノックダウン履歴を負わせ、成虫期は RU486 を与えない実験系を考案した (図 14 と 17A)。2 μ M RU486 含有餌により、幼虫における *Gcn5* 発現量は、RU486 非含有餌を食べたコントロールと比べて、有意にノックダウンされていた (図 17B)。ここで注目したいのは、このノックダウン効率が 22 % とそこまで高くはないことである。一方、羽化後通常の餌を与えられた成虫では、ノックダウン履歴の有無にかかわらず、*Gcn5* 発現量に差はなかった (図 17C)。まず、この軽度な *Gcn5* ノックダウンにより、幼虫から成虫までの発生にどのような影響があるか調べた。幼虫から成虫までの発生時期は 1 日ほど遅れたが、最終的な発生数はコントロールと差がなかった (図 17D と 17E)。

次に、*Gcn5* ノックダウン履歴が寿命を短縮するかを検証した。すると仮説通り、*Gcn5* ノックダウン履歴を持つ成虫の寿命は、コントロールより顕著に短くなった (図 17F と 17G)。また、*Gcn5* ノックダウン履歴を持つ成虫は、体重増加と運動能低下の表現型も示した (図 17H と 17I)。加えて、RU486 の濃度を 2 μ M より上げたとき、発生遅延と寿命短縮が濃度依存的に変化するかも調べた。発生については、遅延だけでなく、発生数自体の低下も認められ、寿命の短縮幅も RU486 濃度依存的に大きくなった (17J と 17K)。

一連の *Gcn5* ノックダウン履歴の表現型は、発生数の低下以外、*nat3 Δ* 栄養履歴を負った成虫の表現型と非常に似ており、*nat3 Δ* 餌摂食による *Gcn5* 機能の低下が、寿命短縮の原因であることを示唆している。一方、*nat3 Δ* 栄養履歴と *Gcn5* ノックダウン履歴の効果を比べると、後者のほうが大きかった。幼虫の H3K9ac レベルの低下も *Gcn5* ノックダウンのほうが著しかったことを考えると (2.2.2.)、幼虫期の H3K9ac 低下と寿命短縮の程度は相関している可能性がある。

2.3.2. 鍵となる組織のひとつは神経系である

Gcn5 はあらゆる幼虫の組織で発現することが知られている (Brown et al.,

2014 ; Leader et al., 2018)。これまでは幼虫全身で *Gcn5* の機能を評価していたが、*Gcn5* 機能が特に重要な組織があるのではないかと問いが生じた。そこで、幼虫の神経系、腸と脂肪体（哺乳類では肝臓と脂肪組織に相当）、マルピーギ管（哺乳類では腎臓に相当）のそれぞれの組織に特異的な 3 種類の *GeneSwitch* ドライバーを用いて、*Gcn5* をノックダウンした（図 18A と 18B ; Yamashita et al., 2021）。まず、幼虫から成虫への発生を調べると、神経系特異的にノックダウンした場合はコントロールと比べて発生が遅延した（図 18C）。発生数については、*GeneSwitch* ドライバーに依らず、コントロールとノックダウン個体との間に差が見られなかった（18C—18E）。これらの発生の表現型は、幼虫全身のノックダウン場合と同様である（図 17E）。

次に、成虫の寿命を調べた。すると驚くべきことに、神経系特異的にノックダウンしたときのみ寿命が短縮し、その他の組織特異的なノックダウンではコントロールと同程度の寿命を示した（図 18F—18H）。さらに注目すべきは、神経系特異的なノックダウンによる寿命短縮の程度が、全身ノックダウンの場合に匹敵したことである（図 17G と 18F）。また、今までと同様、体重増加と運動能低下の表現型も見られた（図 18I と 18J）。以上から、成長期における神経細胞での *Gcn5* 機能が、将来の寿命に必要であることが示唆された。

2.3.3. さらなる死因の追究

幼虫の中樞神経系の神経細胞の多くは、変態期を経て成虫に引き継がれる (Truman, 1999)。そこで、幼虫の中樞神経系 (CNS) の RNA-seq 解析とともに、成虫の CNS の RNA-seq 解析を行うことで、短命の原因を明らかにできるのではないかと考えた。幼虫については、*nat3Δ* 餌を食べた個体とコントロール酵母餌を食べた個体、神経細胞特異的に *Gcn5* をノックダウンした個体と非ノックダウンの個体、計 4 条件の CNS を用いた。成虫については、それぞれの幼虫期の履歴を持って発生した 3 週齢の個体の脳を用いて解析した（表 7）。まず、幼虫の CNS の RNA-seq 解析結果を説明する。*Gcn5* などの KATs 遺伝子群の発現量に代表されるように、ほとんどの遺伝子は *nat3Δ* 餌摂食によって発現変動しておらず（図 19A）、有意に変動した遺伝子は 82 遺伝子のみであった。そこで、有意でなくと

も、発現変動幅がある基準より大きい ($\log_2(\text{nat3}\Delta\text{-fed/control})$ の絶対値が 0.5 超) 632 遺伝子に着目することにした。すると、*nat3* Δ 餌摂食による発現変動方向と *Gcn5* ノックダウンによる発現変動方向が一致する遺伝子が見受けられた (図 19B)。この発現変動の類似性は、幼虫全身のデータほど強くはなかったものの、*nat3* Δ 餌が CNS の神経細胞中の *Gcn5* 機能を低下させうることを示唆している。これらの遺伝子のうち、すでに寿命や老化による神経障害などの表現型が報告されている *Transglutaminase* (*Tg*)、*Proctolin receptor* (*Proc-R*)、*Ecdysone-induced protein 78C* (*Eip78C*) の 3 遺伝子に着目した。*Tg* は *nat3* Δ 餌摂食でも *Gcn5* ノックダウンでも発現低下傾向を示した遺伝子である (図 19C)。*Tg* タンパク質は ϵ - γ -グルタミルリジンイソペプチド結合を形成することでタンパク質の架橋を触媒し、変異体の成虫は加齢に伴って脳の神経変性を示し、コントロールより短命であることが報告されている (Kounatidis et al., 2017)。*Proc-R* 発現も *nat3* Δ 餌摂食と *Gcn5* ノックダウンで低下する傾向を示しており (図 19D)、*Proc-R* タンパク質は神経ペプチドホルモンであるプロクトリンの受容体である。幼虫の脳では、神経分泌細胞などの神経細胞で *Proc-R* 発現が認められており、ノックダウンの成虫は運動機能が低下すると報告されている (Johnson et al., 2003 ; Yu et al., 2016)。*Eip78C* 発現は *nat3* Δ 餌摂食と *Gcn5* ノックダウンで上昇しており (図 19E)、*Eip78C* タンパク質は Peroxisome Proliferator-activated Receptors (PPARs) スーパーファミリーに属するヒトの Rev-Erb に最もよく似た核内ホルモン受容体である (Thummel, 1995)。*Rev-Erb* は PPAR γ のターゲット遺伝子のひとつであり、PPAR γ を過剰発現したマウスでは、食欲と学習能力の低下が報告されている (Moosecker et al., 2021)。これらの 3 遺伝子を短命遺伝子の候補とし、幼虫の神経細胞特異的に *Tg* や *Proc-R* をノックダウンし、*Eip78C* についてはアイソフォーム A の過剰発現を行った。その結果、*Tg* あるいは *Proc-R* のノックダウン履歴を持つ成虫が短命になった (図 19F~19H)。幼虫の中枢神経系において、*Tg* と *Proc-R* が成虫の寿命短縮に寄与している可能性が示された。この仮説については考察 (3.4.) で詳しく述べる。

成虫の脳の RNA-seq 解析結果では、*nat3* Δ 餌摂食と *Gcn5* ノックダウンの間の遺伝子発現変動に、大きな類似性は見られなかった (図 20A)。この結果は、成虫期の短命の原因が、脳の神経細胞における遺伝子発現以外、例えば神経回路や分

泌、シナプス機能、あるいは筋肉など他の組織にあることを示しているのかもしれない。一方、成虫の脳の RNA-seq データには、*nat3Δ* 餌による長期的な効果が現れていた (図 20B)。ほとんど栄養履歴による影響を受けなかった 8,309 遺伝子について、幼虫の CNS における発現の有無を調べると、7,728 遺伝子 (93%) が幼虫の CNS ですでに発現しており、発現していなかった遺伝子はわずか 581 遺伝子 (7.0%) しか存在しなかった。これに対し、栄養履歴による変動傾向があった 632 遺伝子を見ると、幼虫の CNS で発現していなかった遺伝子のほうが多く (392 遺伝子 : 62 %)、傾向が逆転していた。この結果は、幼虫期の神経細胞で発現していなかった遺伝子が、*nat3Δ* 栄養履歴による影響をより強く受けたことを示唆しており、*nat3Δ* 餌は幼虫期を越えて、成虫期まで長期的な効果を及ぼしうると考えられる。

2.4. 短命の原因栄養素はオレイン酸・バリン・酢酸（OVA）である

2.4.1. *nat3Δ* 餌では長鎖脂肪酸と分岐鎖アミノ酸が増加している

前項の結果から、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫では、Gcn5 の機能が低下すること、それが短命の原因となりうることがわかった。では、*nat3Δ* 餌の側で成虫の寿命短縮を引き起こす原因は何だろうか。*nat3Δ* 餌を食べた幼虫全身の RNA-seq 解析データにおいて、Gcn5 変異体との類似性に加えて、もうひとつ注目すべき特徴があった。それは、*nat3Δ* 餌摂食により、脂肪酸 β 酸化経路の遺伝子群の発現が上がっていたことである（図 21 および 22A～22E）。そこで、*nat3Δ* 餌はコントロール酵母餌よりも脂肪酸が豊富だろうと推測した。実際に酵母株中の 炭素鎖 10 から 26（C10 ～ C26）の脂肪酸を測定すると、予想通り軒並み *nat3Δ* 餌で増えていた（図 22F；表 8）。出芽酵母で 90% 以上を占めると言われる（Kaneko & Ito, 1971）C16 と C18 の脂肪酸は約 7 倍に増加しており、極長鎖脂肪酸（C 20 以上または C22 以上）の中には、10 倍以上に増加していた脂肪酸も見られた。なお、今回検出された脂肪酸がすべて飽和脂肪酸または一価不飽和脂肪酸であり、この結果は出芽酵母には多価不飽和脂肪酸は存在しない知見と一致していた。

また、酵母のメタボローム解析データを見ると、分岐鎖アミノ酸（BCAA）も *nat3Δ* 酵母において増加していた（図 23A）。特にバリンは約 8 倍と著しく増えていた。*nat3Δ* 餌を食べた幼虫の遺伝子発現変動を見ても、BCAA 代謝経路の遺伝子発現が上昇していた（図 23B と 23C）。以上から、*nat3Δ* 餌における脂肪酸または BCAA、あるいは両方の増加が、成虫の寿命短縮の原因ではないかと仮説を立てた。mSCM には BCAA は含まれているものの、脂肪酸は一切含まれていない

（4.3.1.）。幼虫は体内で脂肪酸を合成できるが、脂肪酸の供給先として酵母に大きく依存していると考えられる。

2.4.2. 脂肪酸添加実験系の検討

mSCM に脂肪酸と BCAA を添加した餌と添加していない餌を幼虫に与え、発生した成虫の寿命を調べることで、脂肪酸と BCAA を増量した栄養履歴を評価しようと考えた。添加する脂肪酸として、C16 の飽和脂肪酸であるパルミチン酸と C18 のモノ不飽和脂肪酸であるオレイン酸、そして、C26 の極長鎖脂肪酸であるセ

ロチン酸にまず着目し、これらの脂肪酸を mSCM 中に均一に混ぜ込む方法を検討した。しかし、飽和脂肪酸は常温で固体であるため、寒天が冷えて固まっていく中で、飽和脂肪酸が寒天から分離し、どうしても表面に析出してしまった。固まった後に粉碎しようとしても、飽和脂肪酸の塊は非常に固く、十分に細かくできなかった。このような餌を幼虫に与えても、幼虫は餌から逃げて死ぬ、あるいは、体が小さいまま成虫に発生する様子が見られた（データは示さない）。添加の効果を正確に評価することができないため飽和脂肪酸は断念し、常温で液体であるオレイン酸のみに候補を絞った。オレイン酸についても、寒天が固まる間に寒天表面に析出する問題は同様であったが、乳化させると均一に混ぜることができた。具体的には、寒天に混ぜる前に、乳化剤 Tween 80 を用いて予めオレイン酸と水を乳化させておき、それを寒天に添加し、均一に混ぜた (4.3.3.)。この餌上では、幼虫が餌を盛んに食べ、発生した成虫の体は、Tween 80 のみを添加した場合よりも大きくなる傾向があった（データは示さない）。Tween 80 の添加自体は、幼虫から成虫までの発生にも寿命にもほとんど影響しなかった (図 24A と 25A)。

2.4.3. 長鎖脂肪酸 (オレイン酸) と分岐鎖アミノ酸 (バリン) と短鎖脂肪酸 (酢酸) の増量で寿命が短縮する

オレイン酸単独 (0.5 % あるいは 1%)、BCAA 単独 (バリン単独、バリン + イソロイシン)、オレイン酸 + BCAA (オレイン酸 + バリン、オレイン酸 + バリン + イソロイシン) の増量の効果を検証するため、計 6 種類の組み合わせを用意した (図 24B~24G および 25B~25G)。添加する濃度は、それぞれの mSCM 中の濃度とメタボロームデータにおける酵母株間の変動率をもとに決定した (4.3.3.)。これらの餌を幼虫に与えたところ、成虫までの発生は、オレイン酸を添加した餌なら、BCAA の有無に関係なく、遅延し、低下した (図 24B、24C、24F および 24G)。一方、寿命にはいずれの栄養履歴も影響しなかった (図 25B~25G)。

この結果は、寿命短縮にはオレイン酸と BCAA 以外の栄養素が寿命短縮に必要である可能性を示唆している。再度 *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の遺伝子発現変動から手がかりを探し、*Acetyl-CoA synthase* (*AcCoAS*) の発現が *nat3Δ* 餌摂食によって上がっていたことに着目した (図 26A と 26B)。*Saccharomyces pastorousus* では、培地中の酢酸が高濃度になるにつれ、アセチル CoA 合成酵素である *ACS1* と

ACS2 発現が上昇する (Xu et al., 2021)。そこで、酢酸も *nat3Δ* 酵母で増加しており、寿命短縮に寄与するのではないかと考えた。先行研究の多くは、酢酸イオン供給元として、塩基性の酢酸ナトリウム溶液を添加していたが (Wellen et al., 2009; Wong et al., 2017; Tiwari et al., 2020; Miao et al., 2022)、mSCM が pH 3~4 であることを考え、pH 5.2 の酢酸ナトリウム／酢酸緩衝液を代用することにした。添加濃度を検討した後 (図 26C)、酢酸単独、オレイン酸+酢酸、オレイン酸+バリリン+酢酸の 3 種類の餌を幼虫に与えて、発生と寿命を調べた (図 26D—26F および 27)。幼虫から成虫までの発生は上記の結果と同様に、オレイン酸が含まれる条件で遅延し、低下した (図 26E と 26F)。寿命については、オレイン酸、バリリン、酢酸の 3 成分を増量したときのみ、寿命が短縮した (図 27C と 27D)。以上の結果から、オレイン酸とバリリンと酢酸 (OVA) の 3 成分が、将来の寿命短縮に十分であることが示唆された。

2.4.4. 酢酸は *nat3Δ* 餌で増加していない

幼虫期の OVA 餌が寿命を短縮したことを受けて、*nat3Δ* 餌が酢酸に富んだ餌なのかを検証することにした。酵母は 60 %以上の酢酸を細胞外に分泌すること、また、分泌された酢酸濃度は培地中で mM オーダーに上がることが知られているため (Blank et al., 2005; Kajihata et al., 2015; Zhang et al., 2022; Yatabe et al., 2023)、細胞外と細胞内両方の酢酸を測定した (表 8)。測定結果は予想とは異なり、細胞外の酢酸はコントロール酵母と *nat3Δ* 酵母では差はなく、細胞内ではむしろ *nat3Δ* 酵母で減っていた (図 28)。

一方で、成虫の寿命を短縮させた OVA 餌は、次項で述べるように、幼虫においても *nat3Δ* 餌を食べた場合と同様の応答変化を引き起こした。我々は、*nat3Δ* 餌の原因栄養素は OVA そのものではないものの、摂食した側のショウジョウバエで、同様の生体応答を引き起こし、寿命を短縮させるに至ったと考えている (2.5. と 2.6.)。 *nat3Δ* 餌内の原因栄養素の正体については、考察 3.2. で論じる。

2.5. OVA 餌を食べた幼虫と *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の応答は似ている

2.5.1. 遺伝子発現プロファイル上の類似性

OVA 餌を食べた場合と *nat3Δ* 餌を食べた場合を比較したとき、幼虫の応答に類似性があるのだろうか。まず遺伝子発現プロファイルに着目した。コントロール餌を食べた幼虫と、OVA 餌を食べた幼虫の全身から抽出した RNA を用いて、RNA-seq 解析を行い（表 9）、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫の RNA-seq データ（2.2.1.）と比較した。すると、OVA 餌摂食により有意に発現上昇していた遺伝子のうち 50%（527/1058）が *nat3Δ* 餌摂食により発現上昇しており、驚くべきことに *nat3Δ* 餌摂食から見ると、その重複の割合は 76%（527/693）にも上った（図 29A）。発現低下した遺伝子についても両者の重複は大きかった（図 29B）。OVA 餌摂食発現上昇した遺伝子の中には *AcCoAS* があり、さらに、脂肪酸 β 酸化代謝経路や BCAA 代謝経路に属する、*nat3Δ* 餌摂食でも発現が上がっていた遺伝子も多く見られた（図 30）。

2.5.2. OVA 餌は幼虫内のヒストンアセチル化を低下させる

OVA 餌を食べた幼虫の RNA-seq データと、*Gcn5* 変異体と *Ada2a* 変異体の遺伝子発現変動データ（Carré et al., 2008）と比較したところ、*nat3Δ* 餌の場合と同様に（図 11）、OVA 餌摂食により発現が上がった遺伝子は *Gcn5* 変異体と *Ada2a* 変異体でも発現が上がり、OVA 餌摂食により発現が下がった遺伝子においても両変異体で発現が下がる偏向性が見られた（図 31A~31D）。一方、*Kdm4* 変異体の遺伝子発現変動データ（Tsurumi et al., 2019）と比較しても、このような偏向性はなかった（図 31D と 31E）。また、*Gcn5* 自体の発現は OVA 餌による影響を受けなかった（図 32）。以上の結果から、OVA 餌を食べた幼虫においても、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫と同様に、*Gcn5* 機能が低下しているのではないかと仮説を立てた。

この仮説を検証するために、コントロール餌を食べた幼虫、OVA 餌を食べた幼虫に加えて、オレイン酸とバリリン（OV）添加の餌を食べた幼虫を用いて CUT&RUN 解析を行った。コントロール餌を食べた幼虫と OVA 餌を食べた幼虫の解析では、検出された 10,789 の H3K9ac ピークのうち、188 が有意に変動しており、そのうちの 187 が H3K9ac が低下していたピークであった（図 33A）。一方、

コントロール餌を食べた幼虫と OV 餌を食べた幼虫の解析では、検出された 10,291 H3K9ac ピークのうち、わずか 2 ピークしか変動していなかった (図 33B)。次に、OVA 餌摂食により低下した H3K9ac ピークについて、*nat3Δ* 餌摂食や *Gcn5* ノックダウンで低下した H3K9ac ピークとどの程度共通するかを解析した。まず OVA 餌と *nat3Δ* 餌の比較では、H3K9ac 低下ピークそのもの、そして H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子ともに有意な重複が見られた (図 33C 左と 33D 左)。OVA 餌と *Gcn5* ノックダウンの場合は、H3K9ac 低下ピークそのものの重複は有意でなかった (図 33C 右)。一方で H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子は有意に重複しており、近傍の H3K9ac が低下していることが示唆された (図 33D 右)。これらの結果から、OVA 餌が幼虫の *Gcn5* 機能を低下させることが分かった。同時に分析した OV 餌の解析結果も考え合わせると、幼虫期の *Gcn5* 機能と成虫の寿命には強い相関関係、もしくは因果関係があるのかもしれない。

最後に、OVA 餌摂食による H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子と、発現変動した遺伝子の間に重複が見られるかを解析した。得られた重複は小さく (図 33E)、*nat3Δ* 餌摂食や *Gcn5* ノックダウンの場合と同様に (図 16A と 16B)、*Gcn5* 機能の低下は遺伝子発現変動に直接的な影響をもたらさないことが示唆された。

2.6. 幼虫内の Gcn5 機能減弱の原因はアセチル CoA 相対レベルの低下ではないか

2.6.1. *nat3Δ* 餌を食べた幼虫ではパントテン酸が増加する

nat3Δ 餌を食べた幼虫と OVA 餌を食べた幼虫ではともに Gcn5 の機能が低下した (2.2.2. と 2.5.2.)。では、それらの餌を食べた幼虫内で、どのように Gcn5 の機能が低下するに至るのだろうか。*nat3Δ* 餌を食べた幼虫と OVA 餌を食べた幼虫において、特定の代謝経路の遺伝子発現が上昇していた (2.5.1. と 2.6.1.)。このことから、代謝の変化とともに、特定の代謝産物の量の変動し、その変動が Gcn5 機能の低下につながっているのではないかと仮説を立てた。

RNA-seq と同時並行で行ったメタボローム解析では、コントロール酵母餌を食べた幼虫よりも *nat3Δ* 餌を食べた幼虫で、パントテン酸 (ビタミン B₅) が 4~5 倍に増加する顕著な特徴があった。パントテン酸はコエンザイム A (CoA) の前駆体である (図 34A; 表 5)。ショウジョウバエはパントテン酸を自力で合成できない。そのため、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫でパントテン酸が増加したことは、*nat3Δ* 酵母餌で、パントテン酸が多いことを示唆しているのではないかと予想した。しかし、予想とは異なり、酵母餌間でパントテン酸量は変わらなかった (図 34B)。では、どのように *nat3Δ* 餌を食べた幼虫内でパントテン酸が増えるのか。パントテン酸は CoA の前駆体であり、CoA の生合成経路では、まず律速酵素であるパントテン酸キナーゼ (PANK) によってパントテン酸がリン酸化される (図 34C)。PANK は最終生成物である CoA、さらにアセチル CoA などの アシル CoA 種によって負のフィードバック制御を受ける (Leonardi et al., 2005)。以上から、*nat3Δ* 酵母餌を食べた幼虫におけるパントテン酸の顕著な増加は、CoA やアシル CoA 種の増加に起因しているのではないかと考えた。

2.6.2. *nat3Δ* 餌を食べた幼虫ではアセチル CoA の相対レベルが低下する

アセチル CoA は代表的なアセチル基供与体である。アセチル化の程度を左右するのは、アセチル CoA 自体の量ではなく、CoA に対するアセチル CoA の相対比 (アセチル CoA/CoA 比) であることが、細胞フリー系とマウスやヒト細胞を使った研究の両方から報告されている (Tanner et al., 2000; Albaugh et al., 2011 ;

Pietrocola et al., 2015 ; Kinnaird et al., 2016 ; Lee et al., 2014 ; Cluntun et al., 2015 ; Carrer et al., 2017)。我々のパントテン酸データとこの知見から、*nat3Δ* 酵母餌を食べた幼虫では、CoA やアシル CoA 種が、アセチル CoA 以上に増加しているのではないかと、そして、これが Gcn5 の機能を減弱させているのではないかと予想した。そこでまず、コントロール酵母餌を食べた幼虫全身と *nat3Δ* 餌を食べた幼虫全身を用いて、アセチル CoA と CoA の量を同時に測定した。すると予想通り、アセチル CoA 量に差は見られず、CoA は *nat3Δ* 餌を食べた幼虫で増加しており、その分、アセチル CoA/CoA 比は減少していた (図 35A~35C ; 表 10)。

この結果は仮説を支持するものである。一方で、脂肪酸 β 酸化の遺伝子群と *AcCoAS* の発現が *nat3Δ* 餌を食べた幼虫で上昇していた結果とは矛盾するようと思われる。脂肪酸 β 酸化が亢進すると、ミトコンドリア内で脂肪酸アシル CoA の炭素鎖はどんどん短くなり、最終産物であるアセチル CoA が次々と生成され、さらには *AcCoAS* によって生成されるアセチル CoA も増えると予想されるためである。しかし実際は、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫ではアセチル CoA は増えていなかった。したがって、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫では、アセチル CoA を消費する反応も同時に亢進しており、それはヒストンアセチル化以外の反応である可能性が考えられた。改めて *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の遺伝子発現変動データを見ると、脂肪酸の生合成を触媒する酵素 Fatty acid synthase 1 (*FASN1*) の遺伝子発現が上がっていた (図 35D と 35E)。脂肪酸合成の際、アセチル CoA が消費され、CoA が脂肪酸とともに生成される。*nat3Δ* 餌を食べた幼虫におけるアセチル CoA/CoA 比の低下は、脂肪酸 β 酸化と *AcCoAS* 反応と同時に、脂肪酸合成反応も亢進するためであると考えられる。OVA 餌を食べた幼虫においても *FASN1* 発現が上昇しており、同様に、アセチル CoA 相対レベルが低下し、それが Gcn5 機能の減弱を招いている可能性がある (3.3.)。

一方、幼虫内の長鎖脂肪酸アシル CoA についても、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫で増加しているかを調べた (表 10)。脂肪酸アシル CoA は脂肪酸 β 酸化反応などで見られる中間体であり、パルミトイル CoA などの長鎖脂肪酸アシル CoA については、Gcn5 アセチル化の内在性競合阻害剤であることが知られている

(Montgomery et al., 2015 ; Kulkarni et al., 2019)。*nat3Δ* 餌を食べた幼虫内で検出され

た 6 種の長鎖脂肪酸アシル CoA のうち、パルミトイル CoA などの 4 種が増加していた。長鎖脂肪酸アシル CoA が *nat3Δ* 餌を食べた幼虫で増加する原因は、脂肪酸に富んだ餌を食べて、脂肪酸 β 酸化が亢進したためであると推測される。そして、OVA 餌を食べた幼虫においても、長鎖脂肪酸アシル CoA が増える可能性は十分に考えられる。このように、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫と OVA 餌を食べた幼虫で *Gcn5* 機能が減弱する原因は、アセチル CoA よりも、CoA や長鎖脂肪酸アシル CoA などの CoA 関連代謝産物が増えるためであると推測される。さらに 3.3. で議論する。

2.7. 性差

2.7.1. メス成虫の寿命

これまでに述べた成虫の発生以外のデータは、オスのみを用いた解析結果であった。メスにおいても同様の表現型が見られるのだろうか。まず、コントロール酵母の栄養履歴と *nat3Δ* 栄養履歴をそれぞれ負った、交尾済みのメスの成虫を用いて寿命アッセイを行ったところ、*nat3Δ* 栄養履歴によって寿命は短縮せず、表現型に性差があることがわかった (図 36A)。

Gcn5 ノックダウン履歴や OVA 栄養履歴の場合も、*nat3Δ* 栄養履歴と同様に性差が見られるだろうか。メスの寿命はオスの寿命よりも、交尾の有無の影響を受けやすいことが知られている (Austad & Fischer, 2016)。そこで、未交尾メスと交尾済みメスをそれぞれの条件ごとに用意して、評価することにした。まず、*Gcn5* ノックダウン履歴を持たせたメスの寿命は、交尾の有無にかかわらず、コントロールより短縮した (図 36B と 36C)。寿命の短縮幅を雌雄で比較すると、オスでは 32 % (図 17G) であったのに対し、交尾済みメスでは 17%、未交尾メスでは 11% と小さくなった。OVA 栄養履歴の場合は、交尾済みメスではコントロールより短命になり、未交尾メスでは短命にならなかった (図 36D と 36E)。寿命の短縮幅は、オスが 10% (図 27C) または 6.1% (図 27D) であったのに対し、交尾済みメスでは 3.4% と小さくなった。以上から、*nat3Δ* や OVA 栄養履歴、および *Gcn5* ノックダウン履歴は、オスのほうがメスよりも影響を受けやすいことがわかった。

2.7.2. メス幼虫の遺伝子発現

では、どのようにして寿命の性差が生じるのだろうか。まず、幼虫期にすでに性差が生じている可能性を疑った。そこで、メスの幼虫の遺伝子発現変動を調べ (表 11)、オスのデータと比較した。*Gcn5* をノックダウンした幼虫について、雌雄間の遺伝子発現変動を比較したところ、発現変動した遺伝子は有意に重複していた (図 37A)。OVA 餌を食べた幼虫においても、発現変動した遺伝子は、雌雄で大きく重複していた。また、OVA 餌を食べたメスの幼虫の遺伝子発現は、オスの場合と同様に (図 31A と 31B)、*Gcn5* 変異体の遺伝子発現変動データ (Carré et al., 2008) と似ていた (図 38)。一連の結果は、幼虫期には性差が小さく、寿命の性差

は成虫期に生じることを示唆している。

我々の実験系では、いずれの条件においても、オスよりもメスのほうが長命であった（図 9B と 9C 対、図 36A；図 17G 対、図 36B と 36C；図 27C と 27D 対、図 36D と 36E）。もしかすると、幼虫期に負った損傷を成虫期の標準的な食餌により回復させることができ、より長く生きるメスでは、その回復の機会がオスより多いのかもしれない。

第 3 章 考察

3.1. 本研究の発見と因果関係の追究の試み

本研究では、栄養履歴が幼虫期のヒストンアセチル化と成虫の寿命に影響を与えることを明らかにした（図 39）。まず、出芽酵母の単一遺伝子 KO コレクションを幼虫の多様な食餌源として用いることで、幼虫期にとどまらず、成虫期にまで長期的に影響を及ぼし、寿命を短縮させる *nat3Δ* 栄養履歴を発見した。次に、幼虫の応答解析結果から、*nat3Δ* 栄養履歴がヒストンアセチル基転移酵素 Gcn5 の機能を低下させることを見出し、さらに、幼虫期特異的な Gcn5 機能の減弱は寿命を短縮させることを明らかにした。一方、短命の原因栄養素の解明については、酵母の代謝産物解析を行い、*nat3Δ* 酵母で、オレイン酸などの長鎖脂肪酸と、バリンなどの BCAA が増加していることを発見した。そして、オレイン酸、バリン、酢酸を増量させた餌（OVA 餌）を幼虫に与えると、*nat3Δ* 栄養履歴と同様、幼虫期の Gcn5 機能が減弱し、寿命は短縮することを見出した。また、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫内でアセチル CoA 相対レベルが低下しており、これが Gcn5 機能減弱の原因である可能性を示唆した。

一方、栄養履歴による幼虫の Gcn5 機能の低下と、成虫の寿命短縮との間に因果関係があるのかどうかについては明らかにできていない。また、栄養履歴も Gcn5 ノックダウンも幼虫内の H3K9ac レベルを低下させたが、それぞれで低下した H3K9ac ピークの間には大きな重複が見られず、全く同一の制御であるとは言えなかったことにも注意するべきである。これらを検証するためには、*nat3Δ* 栄養履歴または OVA 栄養履歴を負ったショウジョウバエにおいて、Gcn5 機能をレスキューすることによる実験が必要であった。そこで、Gcn5 の過剰発現により、このレスキュー実験を試みようと考えた。まず予備実験として、全身用の *GeneSwitch* コンストラクトのみを持たせた幼虫に、コントロール酵母餌または *nat3Δ* 餌を与えたところ、いずれの酵母餌でも成虫までの発生率は大きく低下し、わずかに羽化した成虫も培地に付着して死んでいた（データは示していない）。そのため、Gcn5 の過剰発現を行った場合、寿命アッセイ用の成虫集めがさらに困難になると予想された。したがって、Gcn5 の過剰発現によるレスキュー実験は断念した。別のレスキュー実

験の手段としては、Gcn5 機能を活性化させる薬剤の添加実験が考えられるだろう。ヒストンアセチル化を回復させるときに、酢酸を培地に添加する方法が採られている (Wellen et al., 2009; Wong et al., 2017 ; Tiwari et al., 2020 ; Miao et al., 2022)。これは酢酸添加により、細胞質内のアセチル CoA を増やし、そして核内のアセチル CoA も増やし、ヒストンアセチル化を促進するためだろう。しかし、本研究の場合、細胞質内のアセチル CoA を増加させても、Gcn5 によるヒストンアセチル化ではなく、脂肪酸合成に優先的に消費される可能性がある。以上の理由により因果関係の検証はできなかったが、代わりに、OVA 餌だけでなく、複数の条件における表現型を調べることによって、強い相関関係を示した。実際、オレイン酸とバリンを増量させた餌 (OV 餌) を食べた幼虫では、ヒストンアセチル化も低下しておらず、成虫の寿命も短縮しなかった (図 25F と 33B)。

3.2. *nat3Δ* 餌における第三の原因栄養素は何か

nat3Δ 餌では、オレイン酸とバリンは増加していたものの、酢酸は増加していなかった。コントロール酵母餌にオレイン酸とバリンを添加して幼虫に与えても、Gcn5 機能の低下も成虫の寿命短縮も見られなかったことから、*nat3Δ* 餌の中において、第三の栄養素がオレイン酸とバリんとともに寿命短縮に寄与する可能性が考えられた。では、その第三の栄養素とは何なのか。酵母株の短鎖脂肪酸量を測定すると、酪酸が *nat3Δ* 酵母の細胞外、細胞内の両方でコントロール酵母より増加する傾向があった (図 28)。C4 脂肪酸である酪酸は、ミトコンドリアでの脂肪酸 β 酸化 1 回によりアセチル CoA に代謝されるため、アセチル CoA の供給元としてよく知られている (Donohoe et al., 2012)。酪酸と酢酸は、細胞内でのアセチル CoA の供給力が高い点で共通している。*nat3Δ* 餌中の寿命短縮を引き起こす原因栄養素はオレイン酸、バリン、酪酸の 3 成分なのかもしれない。

3.3. OVA 餌を食べた幼虫でもアセチル CoA 相対レベルが下がるのか

nat3Δ 餌を食べた幼虫においては、同一試料中のアセチル CoA と CoA を測定し、コントロールと比べて、CoA に対するアセチル CoA の相対比 (アセチル CoA/CoA 比) が低下することを見出した (図 35C)。CoA は、アセチル CoA と

競合し、Gcn5 アセチル化活性を阻害すること、そしてアセチル CoA/CoA 比が Gcn5 のアセチル化活性を左右することが知られている (Tanner et al., 2000 ; Albaugh et al., 2011 ; Pietrocola et al., 2015 ; Kinnaird et al., 2016 ; Lee et al., 2014 ; Cluntun et al., 2015 ; Carrer et al., 2017)。一方、パルミトイル CoA などの長鎖脂肪酸アシル CoA も、Gcn5 アセチル化の内在性競合阻害剤であることが知られている (Montgomery et al., 2015 ; Kulkarni et al., 2019)。したがって、長鎖脂肪酸アシル CoA に対するアセチル CoA の相対比 (アセチル CoA/長鎖脂肪酸アシル CoA 比) も、Gcn5 活性を決定する要素の 1 つになりうる。アセチル CoA/長鎖脂肪酸アシル CoA 比については測定できていないものの、長鎖脂肪酸アシル CoA が *nat3Δ* 餌を食べた幼虫で増加していた結果を考えると (図 35F)、アセチル CoA/長鎖脂肪酸アシル CoA 比も低下していると推測される。ここで、さらにプロピオニル CoA に対するアセチル CoA の相対比 (アセチル CoA/プロピオニル CoA 比) についても考察する。プロピオニル CoA は、アセチル CoA と同様に、Gcn5 にとってアシル基供与体であり、プロピオニル CoA の添加は、ヒストンプロピオニル化の上昇とヒストンアセチル化の低下を招くことが知られている (Montgomery et al., 2015 ; Simithy et al., 2017 ; Trefely et al., 2020)。プロピオニル CoA はバリン代謝の最終産物であるため (図 40)、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫内で増えている可能性が高い。以上のことから、Gcn5 機能の低下をもたらすのは、これら 3 種 (長鎖アシル CoA、プロピオニル CoA、CoA) の化合物に対して、アセチル CoA の相対量が減少することではないかと考察する。

では、OVA 餌を食べた幼虫においても、アセチル CoA 相対レベルが低下しているのだろうか。*nat3Δ* 餌を食べた幼虫でアセチル CoA 相対レベル低下を引き起こしたと考えられる、脂肪酸 β 酸化遺伝子群、BCAA 代謝遺伝子群、*AcCoAS*、*FASN1* の発現上昇は、OVA 餌を食べた幼虫でも同様に起こっていた。したがって、OVA 餌摂食においてもアセチル CoA 相対比レベルが低下する可能性は十分考えられる。一方、長鎖アシル CoA、プロピオニル CoA、CoA、そしてアセチル CoA を同時に測定することは、親水性が異なる物質を扱わなければならない点で非常に困難であると予想される。また、細胞小器官ごとに、これらの代謝産物がどの割合で存在するか、そして *nat3Δ* 餌や OVA 餌により、それぞれの存在量がどう変化して

いくつかの観点も重要である。脂肪酸 β 酸化で生じたアセチル CoA やバリン代謝で生じたプロピオニル CoA はミトコンドリアをそのままの形では通過できない (図 40)。オルガネラ別の代謝産物測定技術は開発されているものの (Trefely et al., 2022)、遠心時の代謝産物の漏れ出しなどの問題が指摘されている。このため、本研究ではバルクの代謝産物量を指標とすることにした。

本研究では、ヒストンアセチル基転移酵素として Gcn5 のみに着目した。しかし、長鎖アシル CoA や CoA、プロピオニル CoA に対する、アセチル CoA の相対レベルの低下が Gcn5 機能減弱を招くならば、*nat3Δ* 餌や OVA 餌により、CBP/p300 など、他のヒストンアセチル基転移酵素の機能も同時に低下していたとしても不思議ではない。ただし、長鎖アシル CoA の 1 つであるパルミトイル CoA は、Gcn5 に対する阻害効果が、CBP/p300 に対する阻害効果よりも 10 倍ほど高いと報告されている (Montgomery et al., 2015)。*nat3Δ* 餌や OVA 餌は、複数のヒストンアセチル基転移酵素の機能を低下させつつも、最も Gcn5 を強く阻害するかもしれない。

3.4. 幼虫の神経細胞における Gcn5 機能低下の可能性と成虫期の死因

幼虫の神経細胞特異的に Gcn5 をノックダウンすると、寿命は幼虫全身でノックダウンした場合と同程度に短縮した (図 17G と 18F)。この結果から、Gcn5 機能が重要な組織のひとつは神経系であることが示された。そして、*nat3Δ* 餌摂食もしくは OVA 餌摂食により、幼虫の神経細胞においても Gcn5 機能が低下しているのではないか、との可能性が浮上する。我々は幼虫の神経細胞においても Gcn5 機能が低下する可能性は高いと考えている。というのも、餌から摂取した脂質は、ショウジョウバエの脂質輸送タンパク質のリポホリンによって血液脳関門を越えて、幼虫の中枢神経系の神経細胞に輸送されること (Brankatschk & Eaton, 2010; Matsuo et al., 2019)、またアミノ酸の輸送体やモノカルボン酸の輸送体が血液脳関門細胞に発現していること (Contreras and Sierralta, 2022) が知られている。以上から、我々はオレイン酸、バリン、酢酸の代謝が神経細胞内で起き、Gcn5 機能の低下を招くとの仮説を立てている。

一方、幼虫の神経細胞において、Gcn5 機能が実際に低下しているかどうか

は検証していない。以下で述べる理由により、この評価は非常に困難であると判断したためである。まず、全身の場合と同様に CNS を用いた CUT&RUN が出来ないかと考えた。しかし、必要な CNS 個数を算出したところ 1,000 個ほどになったため断念した。この計算は、H3K27 トリメチル化 (H3K27me3) の CUT&RUN を行う際 10 個の CNS を用いた情報と、H3K9ac 量は H3K27me3 量の 100 分の 1 程度である情報を根拠としている (Ahmad & Spens, 2019; Feller et al., 2025)。次に、免疫染色による評価系を検討した。実際、予備実験として、*Gcn5* ノックダウンとコントロールの幼虫の中枢神経系を解剖し、神経マーカーと H3K9ac 抗体を用いて免疫染色を行った。しかし、*Gcn5* ノックダウンとコントロールの間の差すら検出できず、免疫染色では困難だと判断した。これは、本研究の *Gcn5* ノックダウンがマイルドであり (図 18B)、H3K9ac マークがゲノムの一部で減弱するだけで、完全には消失しないことに起因していると考えられる。

では、幼虫の神経細胞で *Gcn5* 機能が低下しているとの仮説が正しい場合、どのようにして成虫期の死因にまで結びつくのだろうか。成虫期の脳の遺伝子発現変動を *nat3Δ* 栄養履歴と *Gcn5* ノックダウン履歴を負った個体で調べると、両者の変動は似ていなかった。したがって、*nat3Δ* 栄養履歴を持った個体の成虫の脳では、*Gcn5* 機能そのものは低下していないことが示唆される。さらに、幼虫の神経細胞特異的な *Tg* や *Proc-R* ノックダウンで成虫の寿命が短縮したことを考慮すると、幼虫期の神経細胞における *Gcn5* 機能低下による影響が、直接または間接的に *Tg* や *Proc-R* などの遺伝子群の発現を変化させ、その変化が神経細胞自体や、神経細胞同士のシナプス結合、さらには筋肉や腸など、神経細胞と結合する他の組織の機能障害をもたらすうるかもしれない。その障害が変態期を越えて、成虫へと受け継がれ、寿命の短縮に結びつくのではないだろうか。なお、我々は成虫全身における遺伝子発現変動も解析していたが、直接死因に結びつくような遺伝子を見つけることはできなかった。このことも、成虫の死因は、幼虫期での遺伝子発現変動が原因となって生じた、成虫での細胞機能や組織機能の低下にあるのではないかと考察するきっかけになった。

3.5. 本研究の展望

本研究では、幼虫期特異的なノックダウン手法により、幼虫期の Gcn5 機能の低下が寿命を短縮させることを発見した。Gcn5 に注目したが、3.3. で述べたように、Gcn5 以外のヒストンアセチル基転移酵素の機能も、*nat3Δ* 餌および OVA 餌により減弱する可能性がある。さらに視野を広げて考えると、ヒストンアセチル基転移酵素以外のヒストン修飾酵素の機能も、特定の餌によって変化し、寿命まで長期的な影響を及ぼしうるかもしれない。本研究は、栄養履歴とヒストン修飾酵素遺伝子のネットワークが存在する可能性を投げかけた。このネットワークを解明するには、本研究の手法を参考にして、幼虫期特異的にヒストン修飾酵素遺伝子を網羅的にノックダウンしていく、逆遺伝学的手法を採れば、比較的容易に進むかもしれない。

本研究の発見は、普遍的メカニズムである可能性が高い。オレイン酸、バリン、酢酸はヒトを始めとする動物にとっても重要な栄養素であり、毎日の食事あるいは腸内細菌によって供給される (Kimura et al., 2020 ; Neinast et al., 2019)。また、Gcn5 は酵母から哺乳類までの真核生物で保存されている。実際、成体マウスに高脂質食を与えると、肝臓や生殖腺周囲の白色脂肪組織において、アセチル CoA/CoA 比が低下し、有意ではないものの H3K9ac レベルも低下することが報告されている (Carrer et al., 2017)。これは、オレイン酸、バリン、酢酸の豊富な餌が、あらゆる動物においても、Gcn5 機能の低下と寿命短縮を引き起こしうることを示唆している。

本研究のように、ショウジョウバエの遺伝学的ツールとしての有用性を活かした研究成果が、その他の生物をモデルとした研究へと応用され、普遍的な DOHaD 機構の解明に貢献することを期待する。

第 4 章 材料と方法

4.1. 主な研究ツール

Reagent/resource	Reference or source	Identifier or catalog number
実験動物		
<i>D. melanogaster</i> : <i>wDah</i>	Grandison et al., 2009; Slack et al., 2015	N/A
<i>D. melanogaster</i> : <i>CS</i>	EHIME-Fly Drosophila Stocks of Ehime University	E-10002
<i>D. melanogaster</i> : <i>DaGS</i>	Yamashita et al., 2021	N/A
<i>D. melanogaster</i> : <i>ElavGS</i>	Yamashita et al., 2021	N/A
<i>D. melanogaster</i> : <i>TIGS</i>	Yamashita et al., 2021	N/A
<i>D. melanogaster</i> : <i>UroGS</i>	Yamashita et al., 2021	N/A
<i>D. melanogaster</i> : <i>UAS-Gcn5-RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	33981
<i>D. melanogaster</i> : <i>UAS-mCherry-RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	35785
<i>D. melanogaster</i> : <i>UAS-ProcR-RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	29414
<i>D. melanogaster</i> : <i>UAS-Eip78C-isoformA</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	91372
<i>D. melanogaster</i> : <i>UAS-mCD8::GFP</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	32184
<i>D. melanogaster</i> : <i>UAS-Tg-RNAi</i>	National Institute of Genetics	7356R-1
<i>S. cerevisiae</i> : <i>BY4741</i>	National BioResource Project	BY23849
<i>S. cerevisiae</i> : <i>Yeast MATa Collection</i>	Dharmacon	YSC1053
オリゴヌクレオチドまたは RNA-seq 試薬		
<i>Gcn5</i> qRT-PCR forward primer: AACCAGGAGGTGGCAAATGT	This study	N/A
<i>Gcn5</i> qRT-PCR reverse primer: CGCAGGCAGGTCATCCAAAT	This study	N/A
<i>rp49</i> qRT-PCR forward primer: CAGTCGGATCGATATGCTAA GCTG	Watanabe et al., 2019	N/A

Reagent/resource	Reference or source	Identifier or catalog number
<i>rp49</i> qRT-PCR reverse primer: TAACCGATGTTGGGCATCAG ATAC	Watanabe et al., 2019	N/A
TRIzol	Invitrogen	15596018
RNeasy Mini Kit (50)	QIAGEN	74104
Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina	NEBNext	E7760
CUT&RUN 試薬		
Anti-Histone H3 (acetyl K9) antibody	Abcam	ab4441
CUTANA™ IgG Negative Control Antibody for CUT&RUN and CUT&Tag	EpiCypher	13-0042
cOmplete EDTA-free protease inhibitor	Roche	11873580001
5% Digitonin	Invitrogen	BN2006
pA-MNase	Iwasaki et al., 2021	
N/A		
CUTANA™ E. coli Spike-in DNA	EpiCypher	18-1401
Rnase A	Thermo Fisher Scientific	EN0531
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific	EO0491
AMPure XP Beads	Beckman Coulter	A63880
Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina	NEBNext	E7645
ソフトウェア		
R	R Core Team, 2020	https://www.r-project.org/
SGD	Cherry et al., 2012	https://www.yeastgenome.org
OASIS 2	Han et al., 2016	https://sbi.postech.ac.kr/oasis2/
MetaboAnalyst	Pang et al., 2021	https://www.metaboanalyst.ca
Trim Galore!	https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore	
HISAT2	Kim et al., 2019	http://daehwankimlab.github.io/hisat2/
HTSeq	Putri et al., 2022	https://htseq.readthedocs.io/en/latest/
edgeR	Robinson et al., 2009; McCarthy et al., 2012	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html

Reagent/resource	Reference or source	Identifier or catalog number
DAVID	Huang et al., 2009	https://davidbioinformatics.nih.gov
KEGG	Kanehisa et al., 2012	https://www.kegg.jp
FlyBase	Larkin et al., 2021	https://flybase.org
Biovenn	Hulsen et al., 2008	https://www.biovenn.nl
Bowtie2	Langmead & Salzberg, 2012	https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml
SAMtools	Li et al., 2009	http://www.htslib.org
Picard	https://broadinstitute.github.io/picard/	
MACS2	Zhang et al., 2008	https://hbbctraining.github.io/Intro-to-ChIPseq/lessons/05_peak_calling_macs.html
DiffBind	Stark & Brown, 2011	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DiffBind.html
IGV	Robinson et al., 2011	https://igv.org/doc/desktop/
deepTools	Ramírez et al., 2016	https://deeptools.readthedocs.io/en/latest/

4.2. ショウジョウバエ系統と実験室標準餌

本研究で用いた野生型系統は *white Dahomey* (*wDah*) と *Canton-Special* (*CS*) であり、特に断りのない限り *wDah* を使用した (Grandison et al., 2009 ; Slack et al., 2015)。 *wDah* を含め、 *daughterless GeneSwitch* (*DaGS*)、 *ElavGS*、 *TIGS*、 *UroGS* はすべて小幡史明博士から分与いただいた (Yamashita et al., 2021)。 *CS* は愛媛大学の EHIME-Fly *Drosophila* Stocks (E-10002) から入手した。以下の系統、 *UAS-Gcn5-RNAi* (#33981 ; Zeng et al., 2015)、 *UAS-mCherry-RNAi* (#35785)、 *UAS-ProcR-RNAi* (#29414)、 *UAS-Eip78C-isoformA* (#91372)、ならびに *UAS-mCD8::GFP* (#32184) は Bloomington *Drosophila* Stock Center から入手した。 *UAS-Tg-RNAi* (#7356R-1) は国立遺伝学研究所から入手した。すべての系統のストックは、温度 25°C、湿度 60%、12 時間ごとの明期暗期サイクルの条件の下、バイアル (φ21 mm x 92 mm) あたりの個体数を 80~120 に保ちながら飼育した。実験室標準餌の組成は、Watanabe et al., 2017 または Watanabe et al., 2019 に記載の通り、水 1 L あた

り、コーンフラワー（日本製粉）51 g、コーングリッツ（日本製粉）26 g、乾燥酵母（アサヒフードアンドヘルスケア）44 g、グルコース（加藤化学）110 g、寒天粉末（松本寒天産業株式会社）8 g、および、防腐剤であるプロピオン酸（ナカライテスク、29018-55）2.9 mL、10% p-ヒドロキシ安息香酸ブチル（ナカライテスク、06327-02 を 70% エタノールに溶解）2.9 mL である。

4.3. Live yeast-fly assay

4.3.1. 酵母株の培養

まず、出芽酵母のコントロール株 BY4741（National BioResource Project、BY23849；*MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*）または 各変異株（Yeast MATa Collection Dharmacon, YSC1053）のグリセロールストックを YPD プレート [50 g/L YPD 培地（Clontech、630409）、20 g/L 寒天（ナカライテスク、01162-15）] 上に広げ、温度 30°C で 2 日間培養した。その後さらに、Modified synthetic complete medium (mSCM) プレート [60 g/L グルコース（ナカライテスク、16806-25）、5 g/L 硫酸アンモニウム（ナカライテスク、02620-75）、1.71 g/L Yeast Nitrogen Base（Sunrise Science Products、1500-100）、0.79 g/L Complete Supplement Mixture（Sunrise Science Products、1001-010）、20 g/L 寒天；mSCM は脂肪酸もコレステロールも含まない（表 13）]それぞれの酵母株を光学密度（OD₆₀₀）60~70（ $\sim 8 \times 10^8$ cells/mL）になるまで、滅菌水に懸濁した。40 μ L の酵母懸濁液（ $\sim 3.2 \times 10^7$ cells）を、チューブ中の 5 mL mSCM の表面に添加し、30°C、2 日間培養した。その後、次に述べるように、無菌化したキイロショウジョウバエ胚を置いた（図 5B 下）。

4.3.2. ショウジョウバエ胚の無菌化

無菌化ショウジョウバエ胚は、Watanabe et al., 2019 および Mure et al., 2023 に概ね沿った方法で調製した。2 日以内に羽化した CS または *wDah* 成虫を回収し、実験室標準餌で 3 日間交配させた（バイアルあたり ~ 50 匹の成虫）。これらの成虫を採卵容器に移し（容器あたり ~ 250 成虫）、酵母ペーストをのせたリンゴジュース寒天プレートを毎日交換しながら、3~6 日間飼育した。その後まず、新たな酵母ペースト付きのプレート上で 1 時間産卵させ（午後 4 時~5 時）、メスが長時間

抱え込んでいる卵を一旦放出させた（プレクリア）。続いて、本採卵のために、新たな酵母ペースト付きのプレート上で 3 時間産卵させた（午後 5 時～8 時）。プレートを回収後、さらに、25 °C で翌朝 7 時半まで置いた。その後、0.7% NaCl+0.3% Triton X-100 で洗浄した。すでに孵化した幼虫を実体顕微鏡下で除去した後、胚を 50% 漂白剤での 3 分間の浸漬、滅菌水での洗浄、70% エタノールでの 5 分間の浸漬、滅菌水で 2 回洗浄を順に行い、胚を無菌化した（産卵後約 12～15 時間）。これらの無胚化胚を粘性の高い溶液（2.5% Polyvinylpyrrolidone+0.1% TritonX-100；相垣敏郎博士、佐藤由紀子博士からの私信）に懸濁し、20 μ l の懸濁液（～30 個の胚）を、各酵母が増殖した mSCM チューブに添加した。その後、オートクレーブした綿球（川本産業、#20；図 5B 下）でふさぎ、成虫が発生するまで温度 25°C、湿度 90% 以上で飼育した。

4.3.3. コントロール酵母餌への添加実験

オレイン酸（東京化成工業、O0180）、バリリン（ナカライテスク、36108-42）、イソロイシン（ペプチド研究所、2712）、酢酸ナトリウム／酢酸緩衝液（3M；pH 5.2；ナカライテスク、06893-24）を、Tween 80（ナカライテスク、11718-22）をそれぞれ mSCM に添加したときの最終濃度は、特に断りのない限り、オレイン酸 0.5% v/v、バリリン 1.54 g/L（mSCM 中 0.14 g/L + 1.4 g/L）であり、イソロイシン 0.3 g/L（mSCM 中 0.05 g/L + 0.25 g/L）、酢酸ナトリウム／酢酸緩衝液は 25 mM、Tween 80 は 0.05% v/v である（Maruyama et al., 2024）。バリリン最終濃度は、ショウジョウバエ用の完全合成培地 FLYAA 中の 1.2 g/L または HolFast 中の 1.25 g/L よりわずかに高く（Piper et al., 2017；Sorge et al., 2025）、イソロイシン最終濃度は両完全合成培地の約 4 分の 1 である。バリリンとイソロイシンの添加量は、mSCM 中のそれぞれの濃度と、コントロール酵母と比較した *nat3Δ* 酵母中の増量に基づいて決定した（図 23A）。添加培地の作製方法を簡単に説明すると、まず 10 倍濃度の BCAA 溶液をフィルター滅菌して（0.22 μ m）調製した。10 倍濃度の乳化液について、水と 5% Tween 80 あるいはオレイン酸を 1 mL あたり 1 秒間超音波処理した。そして、オートクレーブした mSCM 寒天培地が固まる前に、これらの溶液を添加した。なお、mSCM 中の水の容量は、添加溶液の容量分予め加減し、オートクレーブ

した。

4.3.4. 46 酵母変異株の分離

5,153 株の酵母単一遺伝子ノックアウト株 (Dharmacon、YSC1053) を CS 幼虫に摂食させ、蛹化の時期および蛹化率がコントロール酵母を摂食させた場合よりも変わる 46 株の酵母を単離した探索は、高橋優喜氏によって、以下の通りに行われた (高橋、2017)。コレクションの酵母変異株は 96 マイクロウェルプレート、計 57 枚のそれぞれのウェルに分けられており、-80°C で保存し、そこから、YPD マスタープレートを作製し、実験に用いた。まず、YPD マスタープレート中の酵母株を、滅菌済み 96 ピンレプリケーター (Watson、4820-963S) を用いて 2 枚の YPD プレート上にスタンプし、30°C で 2 日間培養した。その後、6 枚の mSCM プレートに複製し、30°C で 2 日間培養した。この 6 枚の mSCM プレートのうち 5 枚から、96 ピンレプリケーターを用いて各酵母株を回収し、96 マイクロウェルプレートの各ウェル中の 60 μ l の滅菌水に懸濁した。それぞれの酵母懸濁液 40 μ L を mSCM チューブに添加し、30°C で 2 日間培養した後、各チューブに無菌化した CS 胚を 30 個ずつ加え、産卵後 8 日目に蛹の数を数え、蛹化度を評価した。

一次スクリーニングでは、各マスタープレート内の酵母株同士を比べて、蛹化率が低い、あるいは高い酵母株を残すことにした。これはマスタープレートにコントロール酵母株が含まれていなかったためと、スクリーニングをできるだけハイスループットにするためでもあった。1 株につき 2 レプリケート を用意し、両 レプリケートで蛹が 5 匹以下あるいは 15 匹以上発生した株を基準としたところ、それぞれ 284 株、186 株分離できた。二次スクリーニングでは、これら 470 株とコントロール酵母株から成る新たなマスタープレートを作製し、酵母変異株については 3 レプリケート、コントロール酵母株については計 10 レプリケート用意して蛹化アッセイを行った。その結果、コントロール酵母を与えた幼虫と比較して蛹化率を低下させた酵母変異株は 162 株であり、蛹化率を上昇させたのは 45 株であった。これら 207 株について、5 レプリケート用意して再度スクリーニングを行い、46 株を分離した。

4.4. 幼虫期特異的なノックダウンまたは過剰発現

GeneSwitch 系統の未交尾雌と *UAS* 系統の雄をそれぞれ集め、性成熟のために実験室標準餌上で 1~3 日間飼育し、その後雌雄を同じ餌バイアルに入れ、3 日間交配させた。そして、採卵容器で 2~3 日飼育した後、一晚（午後 3 時~翌朝 8 時）産卵させ、0.7% NaCl+0.3% Triton X-100 で洗浄し、高粘性溶液に懸濁した（詳細は上記の「ショウジョウバエ胚の無菌化」を参照）。40 μ l の懸濁液（~120 個の胚）を、RU486（2~20 μ M）またはエタノール（RU486 0 μ M）を添加した各バイアルに置き、人工気象器（NK System、LPH-410NS）内で温度 25°C、湿度 60% で飼育した。RU486 ストック溶液の濃度は 50 mM [1 g の RU486（東京化成工業、M1732）を 46.6 mL のエタノールに溶解] であり、-20°C で 3 ヶ月間保存した。

4.5. 寿命アッセイ

寿命アッセイは、Linford et al., 2013 と Piper & Partridge, 2016 に従って行った。Live yeast 栄養履歴の場合は 3 日以内に（産卵後 10~13 日目）、ノックダウンまたは過剰発現履歴の場合は 1 日以内に（産卵後 10~11 日目）羽化した成虫を回収した。その後成虫を実験室標準餌上で 2 日間交尾させ、オス 10 匹ずつまたはメス 10 匹ずつに分け、2~4 日ごとに新たな餌バイアルに移しながら、個々のバイアルについて死亡数と打ち切り数を記録した。打ち切り個体とは、アッセイの途中で逃がした個体など、生死を最後まで追跡できなかった個体を指す。なお、図 19F~19H で使用した実験室標準餌では、防腐剤である p-ヒドロキシ安息香酸ブチルの濃度を 2 倍にした。寿命アッセイの間、成虫は、USB ファンを回した人工気象器内で（NK System、LPH-410NS）、温度 25°C、湿度 60%、12 時間ごとの明暗サイクルで維持された（Seong et al., 2020）。人工気象器内の場所の不均等性が寿命に影響しないように、成虫を新たな餌バイアルに移し終わった後、すべてのバイアルラックの位置をずらした。解析には OASIS2 を用いた。この解析結果は表 2 に示している。

4.6. クライミング能テスト

オスの成虫についてクライミング能を評価した（Ali et al., 2011）。図 9F は、同

じ個体が入ったバイアルを 2 週齢から 3 週齢 にかけて見た結果であり、図 18J は、それぞれの *Gcn5* ノックダウン履歴を持つ 2 週齢の成虫の結果である（図 17I と 18J)]。まず、10 個体を 1 本の実験室標準餌バイアルに入れ、これと空のバイアルをテープで垂直に接合した。空のバイアルを下にして、成虫を新しい環境に 1 分以上順応させ後、成虫を空のバイアルの底に静かに落とし、10 秒以内に 6 cm 以上登った成虫の数を数えた。1 分以上の休息時間を設けながら、このアッセイを同じバイアルについて 3 回繰り返した。死んだり餌にくっついたりした成虫のクライミング能はゼロとした。そのような成虫は *ElavGS > Gcn5 KD+* のわずか 3 個体のみであった。（図 18J）。各バイアルにおける 3 回の試行の平均値をプロットした。

4.7. ショウジョウバエまたは酵母のメタボローム解析

4.7.1. 凍結サンプルの調製

ショウジョウバエ幼虫のサンプル調製では、オスの後期 3 齢幼虫を PBS で洗浄し、体に付着している餌を除去しながら、レプリケートあたり 13~15 匹集めた。成虫のサンプル調製では、CO₂ 麻酔をかけながら、1 週齢または 5 週齢のオスの成虫 20 匹を回収し、1 レプリケートとした。これらの幼虫または成虫をチューブごと、精密天秤（Sartorius、CP225D）で秤量した後、液体窒素で凍結した。酵母サンプルの調製については、酵母株を YPD プレート上で 30°C、2 日間培養し、mSCM プレート上で 30°C、2 日間培養し、さらに新たな mSCM プレート上で 30°C、2 日間培養した。そして 100±2 mg 分の酵母株をそれぞれ回収し、液体窒素で凍結した。

4.7.2. メタボローム解析

以降のサンプル調製および分析データの取得は、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC-MS/MS）を用いた島津テクノリサーチ（一次代謝産物 Ver.2）、またはキャピラリー電気泳動・質量分析法（CE-MS）および液体クロマトグラフィー・質量分析法（LC-MS）を用いた LSI メディエンスにより、ブラインド状態で行われた。まず、破碎したサンプルにメタノールとクロロホルムを加え（島津テクノリサーチでは、内部標準物質として 2-モルフォリノエタンスルホン酸と 10

mM HCl も同時に添加)、遠心分離した後、上層を蒸発させた。その後島津テクノロジーでは、サンプルを 10 mM HCl に溶解し、LC-MS/MS システムに注入した (液体クロマトグラフィー: 島津製作所、LC-30A; 質量分析器: 島津製作所、LCMS-8050; カラム: Sigma-Aldrich、Discovery HS F5-3、2.1 mm I.D. × 150 mm、3 μm; 溶媒 A: 0.1% ギ酸/水; 溶媒 B: 0.1% ギ酸/アセトニトリル; 温度: 40°C; 流速: 0.25 mL/分)。LSI メディエンスでは、サンプルを 10% アセトニトリルに溶解し、LC-MS システム (液体クロマトグラフィー: LC: Agilent Technologies、Agilent 1260 Series; 質量分析器: Agilent Technologies、6520 Q-TOF; カラム: 資生堂、CAPCELL PAK C18 IF、2.0 mm I.D. × 50 mm、2 μm; 溶媒 A: 5 mM 酢酸アンモニウム; 溶媒 B: アセトニトリル; 温度: 40°C) または CE-MS [キャピラリー電気泳動: Agilent Technologies、Agilent CE; 質量分析器: Agilent Technologies、6520 Q-TOF; カラム: GL Science、Polymicro tube、50 μm I.D. × 1000 mm; シース液: 5 mM 酢酸アンモニウム/50% メタノール; 電解液: 1 M ギ酸 (陽イオン) および 20 mM ギ酸アンモニウム/20 mM 酢酸アンモニウム、pH 10 (陰イオン); 電圧: ±30 kV] に注入した。

得られた生データ (各サンプル重量で補正したピーク面積) は、MetaboAnalyst 5.0 または MetaboAnalyst 6.0 で解析した。データ変換で “Log transformation”、*t* 検定で “Parametric” オプションを付ける変更点以外は、Watanabe et al., 2019 に記載の方法に従って行った。LSI メディエンスのデータについては、4 つの測定方法 [CE-MS (陰イオン)、CE-MS (陽イオン)、LC-MS (陰性)、LC-MS (陽性)] ごとに解析した。

4.8. 体重測定

幼虫の体重測定は 4.7. に記載した通りである。成虫については、1 週齢または 5 週齢のオス成虫を CO₂ で眠らせ、1 匹ずつ超精密天秤 (Sartorius、MCA3.6P) に乗せ、体重を測定した。

4.9. RNA-seq 解析

4.9.1. RNA サンプル調製

我々のプロトコール (Watanabe et al., 2019; Kanaoka et al., 2023; Mure et al.,

2023) に従った。幼虫全身の RNA-seq では、オスまたはメスの後期 3 齢幼虫を PBS で洗浄し、それら 5 匹を 1 レプリケートとした。成虫全身の RNA-seq では、レプリケートあたり 10 匹のオスの成虫 (1 週齢または 5 週齢) を CO₂ 麻酔により集めた。そして、これらのサンプルを Power Masher II (ニッピ、893002) を用いて、TRIzol 溶液中 (Invitrogen、15596018) で破碎した。

CNS RNA-seq では、幼虫の CNS (脳と腹側神経索) オスの後期 3 齢幼虫 5 頭ずつから解剖する、または成虫の脳をオスの成虫 (3 週齢) から解剖し、これらの組織を 5 個集めるまで、氷冷した PBS 中に置いた。そして TRIzol 溶液中で破碎した。抽出した RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, 74104) を用いて精製した。ライブラリ調製からシーケンスデータの取得までは、京都大学医学・生命科学研究支援機構 (iSAL) 次世代シーケンス解析室に、ブラインド状態で委託した。ライブラリー調製には Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEBNext, E7760) が用いられ、シーケンシングは Illumina NextSeq 500 シーケンサーで、シングルエンドラン、リード長 75 bp、サンプルあたり 20 M リードの深さになるように行われた。ただし、OVA 餌を食べたオス幼虫の解析ではシーケンスリード長が 150 bp であったため、解析時に 3' 側の余分な 75 bp リードは Trim Galore! v0.6.7 hardtrim5 ツールで除去した。

4.9.2. RNA-seq データ解析

得られたシーケンスデータは、Watanabe et al., 2019 に記載の手順に沿いながら、下記のように解析した。まず、マッピングツール HISAT2 v2.2.1 (オプション: --rna-strandness R) を用いて、FlyBase からダウンロードした FASTA ファイル (dmel-all-chromosome-r6.04.fasta) と転写アノテーションファイル (dmel-all-r6.04.gtf) にマッピングし、HTSeq の htseq-count v2.0.2 (オプション: -r pos -s reverse -a 10) を用いてマッピングリード数をカウントした。edgeR v3.30.3 による発現解析の際、以下のデータセット、5 週齢のオス成虫全身データセット、幼虫および成虫の CNS 全データセット、および OVA 餌を与えたメスの幼虫全身のデータセットについては、バッチ効果を考慮した。Gene Ontology エンリッチメントや KEGG Pathway エンリッチメント解析では、Database for Annotation, Visualization and

Integrated Discovery (DAVID) Functional Annotation Chart を用いた。

先行研究のマイクロアレイデータ (Carré et al., 2008 ; Tsurumi et al., 2019) との比較解析では、まず FlyBase ID Validator FB2023_04 を用いて各遺伝子の FlyBase ID を更新し、我々が使用した転写アノテーションファイル (dmel-all-r6.04.gtf) に存在しない遺伝子は除外した。*nat3Δ* 餌または OVA 餌を食べた幼虫内の遺伝子発現変動と、各変異体における遺伝子発現変動の相関度は (図 11B、11D、11F、31B、31D、31F、および 38B)、それぞれの図の太字で示された 4 つの数字を用いて算出した Cohen の κ 係数 (Cohen, 1960 ; Landis & Koch, 1977) によって評価した。Hypergeometric test (Subramanian et al., 2005; Sadeghi et al., 2011) を用いて、有意変動遺伝子の重複の統計的有意性を検定した (図 29A、29B、37A、および 37B)。例えば、図 37A の Up 遺伝子の重なりについて、以下のコードを R に入力した：
phyper(132-1, 1534, 11620-1534, 730, lower.tail=FALSE)。11,620 という数字は、*Gcn5* KD±のオスの解析とメスの解析で検出された全遺伝子を意味する。OVA 餌を食べた幼虫のオスのデータとメスの解析の全遺伝子数は 11,829 であった。RNA-seq の詳細な解析結果を、表 4、表 9、および表 11 に掲載している。

4.10. qRT-PCR

Watanabe et al., 2019 に記載されている手順通りに行った。オスの後期 3 齢幼虫 5 匹分の RNA は精製後 80 μ L の水で溶出し、1 週齢のオス成虫 10 個体分の RNA は 40 μ L の水で溶出した。これらの RNA サンプルのうち、500 ng を cDNA 合成に用いた。95°C で 1 分間の初期変性後、PCR を 40 サイクル行った (95°C で 15 秒間、60°C で 1 分間)。相対発現値 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ の算出について、まず *Gcn5* の Ct 値と *rp49* の Ct の差から各サンプルの ΔCt 値を算出した。そして各 ΔCt 値から、コントロールサンプルの ΔCt の平均値を差し引いた値を $\Delta\Delta Ct$ 値とした。使用したプライマー配列は 4.1. に記載している。

4.11. CUT&RUN

4.11.1. DNA サンプル調製

サンプル調製は先行研究の手順を参考にした (Skene & Henikoff, 2017; Skene

et al., 2018 ; Meers et al., 2019 ; Ahmad & Spens, 2019)。レプリケートあたり、後期 3 齢幼虫 5 匹を、PBS で洗浄した後、パラフィルム上の Wash+ 緩衝液の液滴 [20 mM HEPES pH 7.5、150 mM NaCl、0.1% BSA、0.5 mM spermidine の溶液 50 mL あたり 1 錠の cOmplete EDTA-free プロテアーゼ阻害剤 (Roche、11873580001)] 中で解剖し、血球組織を含むすべての組織と 残りの Wash+ 緩衝液を、氷冷したマイクロチューブに移した。遠心 (600 g、4°C、3 分) し、上清を除去した後、ペレットを DBE 緩衝液 [2mM EDTA、0.05%ジギトニン (5%ストック: Invitrogen、BN2006)、Wash+緩衝液] に緩やかに再懸濁し、4°C で 10 分間低速で回転させながらインキュベートした。遠心後、DBE 緩衝液で 1:100 に希釈した抗体液に置換し、低速で回転させながら 4°C で一晩インキュベートした。用いた抗体は、抗 H3K9ac 抗体 (Abcam、ab4441) と IgG 抗体 (EpiCypher、13-0042 ; コントロール) である。その後、サンプルを DBE 緩衝液で洗浄し、DBE 緩衝液で希釈した 700 ng/mL pA-MNase 中で 4°C、1 時間低速で回転させながらインキュベートした。pA-MNase は吉竹良洋博士からいただいた (Iwasaki et al., 2021)。遠心後、Wash+ 緩衝液で洗浄し、新たな Wash+ バッファーに緩やかに再懸濁し、塩入りの氷水の中で 3~5 分間 0°C に冷やした。その後 2x Rxn 緩衝液 (3.8 mM CaCl₂/Wash+ 緩衝液) を加えて、pA-MNase を活性化し、チューブを再び氷水に戻して切断反応を開始した。0°C で 30 分間インキュベートした後、2x STOPyR 緩衝液 [2 pg/mL E. coli Spike-in DNA (EpiCypher、18-1401)、62.6 µg/mL RNase A (Thermo Fisher Scientific、EN0531)、200 mM NaCl、20 mM EDTA、4 mM EGTA] を加えて混合し、切断反応を停止した。その後、サンプルを 37°C で 30 分間インキュベートして断片を遊離させ、遠心によって上清を回収した。サンプルに SDS と Proteinase K (Thermo Fisher Scientific、EO0491) を加え、50°C で 2 時間インキュベートした後、AMPure XP Beads (Beckman Coulter、A63880) を用いて DNA を回収した。最後に、DNA を 13 µL の水に溶出し、-20°Cで保存した。各条件のレプリケート数は、H3K9ac が 2 つ、IgG コントロールが 1 つである。

ライブラリ調製からシーケンスデータの取得までは、京都大学医学・生命科学支援機構 (iSAL) 次世代シーケンス解析室に、ブラインド状態で委託した。各 DNA サンプルから、Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEBNext、E7645)

を用いてライブラリー調製され、Illumina NextSeq 500 シーケンサーでペアエンドラン、リード長 75 bp、サンプルあたり 20 M リード（10 M フラグメント）の深さになるようにシーケンスされた。

4.11.2. CUT&RUN データ解析

CUT&RUN データの解析は、概ね先行研究に従って行われた (Smolko et al., 2018 ; Uyehara & McKay, 2019 ; Hu et al., 2020 ; Montgomery et al., 2020 ; Zheng et al., 2020)。得られたシーケンスデータについて、Trim Galore! v0.6.7 (オプション: -paired--fastqc) を用いて FastQC でアダプターをトリミングした。そして、マッピングツール Bowtie2 v2.2.5 (オプション: --local--very-sensitive-local---no-unal--no-mixed--no-discordant--phred33 -I 10 -X 700) を用いて、FlyBase からダウンロードし、RNA-seq 解析にも使用した *D. melanogaster* ゲノム r6.04 にマッピングされた。マッピング品質が 10 未満のリードは SAMtools v1.3.1 で除去した。また、PCR 重複産物は Picard v2.18.29 の MarkDuplicates で除去した。MACS2 v2.2.6 (オプション: -f BAMPE -g dm -B--keep-dup all -q 0.05) を用いて H3K9ac 特異的なピークをコールした。コントロールと *nat3Δ* 餌を与えた幼虫の間、*Gcn5* KD±サンプル間、またはコントロールと OVA 餌を与えた幼虫の間で、H3K9ac の変動は、1 kb ピーク間隔 (summit = 500) およびバックグラウンドビン上の RLE 正規化とのオプションを付きで、DiffBind v3.6.5 により調べられた。1 kb とのピーク間隔との決定は、Integrative Genomics Viewer (IGV) でのデータを見たときのピーク間隔と、先行研究の知見 (Kharchenko et al., 2011 ; Yin et al., 2011) の両方を参考にしている。それぞれのサンプルセットにおける有意低下ピーク (FDR 0.05 未満) の分布の重なりは、deepTools v3.5.1 の intersectBed ツールにより特定された。低下ピークを含む遺伝子は、低下ピークのデータファイルと、FlyBase から取得した GTF ファイル (dmel-all-r6.04.gtf) から生成した最長遺伝子アイソフォームの BED ファイルを用いながら、intersectBed ツールにより同定された。図 15A、15B、33C、および 33D における重複の統計的有意性の検定には、Hypergeometric test (Subramanian et al., 2005 ; Sadeghi et al., 2011) を用いた。例えば 図 15A では、次のコードを R に入力した: phyper(97442-1, 1451090, 15443594-1451090, 889454, lower.tail=FALSE). 15,443,594 という

う数字は、*nat3Δ* 餌を与えた幼虫サンプルセットと *Gcn5* KD サンプルセットで検出された H3K9ac ピークの全長を意味し、他の数字は表 6 に記載している。図 15B と 33D では、各データセットにおける、検出されたすべての H3K9ac ピークを含む遺伝子数を検定に用いた（図 15B では 9,602、図 33D 左では 9,626、図 33D 右では 9,405）。例えば図 15B では、次のコードを R に入力した：phyper(220-1, 1310, 9602-1310, 796, lower.tail=FALSE)。図 13B および 16D で使用した bigwig ファイルは、deepTools の bamCompare（オプション：--operation subtract--binSize 10）によって、正規化前の H3K9ac bam ファイルと IgG ファイルから作成したものである。IGV 上で図 13B を取得する際、負の値を非表示にするオプションを加えた。

4.12. 酵母の脂肪酸解析

4.12.1. 中鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸および極長鎖脂肪酸

4.7. と同様の方法で凍結酵母サンプルを調製した。これらのサンプル分析は、かずさ DNA 研究所において、中鎖から極長鎖脂肪酸を測定することに特化したプロトコールで行われた。なお、エステル体であるか、遊離脂肪酸などの非エステル体であるかは区別できていない。まず、サンプルに 3：10 メタノール：メチル tert-ブチルエーテル混合液を加えた後、ジルコニアビーズミックス（φ 0.5 mm + φ 5 mm）を用いて破碎し、超音波処理した。遠心後、メチル tert-ブチルエーテル画分を回収し、窒素ガスを噴霧して乾燥させた後、10% 三フッ化ホウ素メタノールを添加した。メチルエステル化後、水とヘキサンを加え、遠心した。ヘキサン画分の脂肪酸メチルエステルは、2 つの注入モード、スプリットとスプリットレスそれぞれで、ガスクロマトグラフィー・質量分析（GC-MS：島津製作所、QP-2010 Ultra、オートサンプラー：島津製作所、AOC-5000 Plus、カラム：Agilent Technologies、DB-5ms、0.250 mm I.D. × 30 m、0.25 μm；気化室温度：280°C；カラムオーブン温度：40°C、2 分 → 6°C/分 → 320°C、5 分）により分析された。

4.12.2. 酵母細胞内部の短鎖脂肪酸

上記と同様、凍結酵母サンプル調整後、かずさ DNA 研究所に分析を委託した。まず、100 mg の酵母ペレットに対して 300 μl のメタノールを添加し、φ5 mm

のジルコニアビーズを用いて破碎し (TissueLyser、25 Hz、2 分)、遠心した (20,000 g、10 分、室温) 次に親油性物質を以下のように除去した： 100 μ l のメタノール、100 μ l の 75% メタノール、100 μ l の遠心上清を MonoSpin C18 カラム (GL Science) にこの順序で加え、フロースルーを回収し、これを 固相抽出 (SPE) フロースルーとした。誘導体化するために、まず SPE フロースルーを 75% メタノールで 1:1 に希釈した。次にこの希釈液 50 μ l を、順に以下の溶液 50 μ l ずつと混合した： 5 μ l/mL 2-エチル酪酸、50 mM 3-ニトロフェニルヒドラジン、50 mM 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、7.5% ピリジン (これらの溶液の溶媒はすべて 75%メタノール である)。続いて、暗所、25°C で 30 分間インキュベートし、250 μ l の 1% ギ酸/75%メタノールを加え、濾過した (親水性 PTFE、0.2 μ m)。そして、ろ液 1 μ L を LC-MS システム (島津製作所、LCMS-8050) に注入した。

4.12.3. 酵母細胞外部の短鎖脂肪酸

これまでの凍結サンプル調製方法とは異なり、酵母を mSCM 液体培地で培養した (Yatabe et al., 2023)。各酵母株を YPD プレート上で 30°C、2 日培養した後、2 mL の mSCM 液体培地を入れた 18 mL ガラス試験管中にそれぞれの株を懸濁した。このとき吸光度 OD₆₀₀ 値が 0.1 になるように調整した。30°C、24 時間、180 rpm の振盪培養後 (前前培養)、再び 2 mL の mSCM 液体培地中に OD₆₀₀ 値が 0.1 になるように懸濁し、培養した (前培養; 30°C、16 時間、180 rpm)。そして、本培養も同様に行った (30°C、24 時間、180 rpm)。培養終了後、シリンジに取り付けた 0.45 μ m フィルター (ナカライテスク、06544-94) を以て培養液 1 mL をろ過し、液体窒素で凍結した。この後、かずさ DNA 研究所で分析され、親油性物質の除去時には、100 μ l のメタノール、100 μ l の 75%メタノール、100 μ l の 1:3 サンプル:メタノールの混合溶液を MonoSpin C18 カラムにこの順で添加し、その後、上記と同様の誘導体化および LC-MS 分析ステップを経た。

以上、かずさ DNA 研究所での脂肪酸分析すべては、ブラインド状態で行われた。得られた生データについては GC-MS 注入モードまたは LC-MS 分析ごとに分けて、4.7. と同様に MetaboAnalyst で解析した。

4.13. 幼虫の CoA 関連代謝産物測定

4.13.1. アセチル CoA および CoA

4.7. に記載の通り、幼虫の凍結サンプルを調製した。アセチル CoA と CoA の定量は島津テクノリサーチと議論し、プロトコルを最適化した。まず、50 μ M 1,4-ジチオエリスリトール／5% 5-スルホサリチル酸の溶液中でサンプルを破碎し、メタノール添加後、これらのサンプルを遠心し、上清を LC-MS/MS システムに注入した [カラム：GL Science、Inertsil ODS-3、2.1 mm I.D. $\times$ 50 mm、3 μ m；溶媒 A：10 mM 酢酸アンモニウム；溶媒 B：メタノール；温度：40°C；流速：0.2 mL/分；走査：ポジティブ ESI]。検量線は、検量線用サンプルのピーク面積値 [(25～2500 ng/mL アセチル CoA トリリチウム塩／5% 5-スルホサリチル酸溶液+50 μ M 1,4-ジチオエリスリトール)、または (25～2500 ng/mL CoA トリリチウム塩／5% 5-スルホサリチル酸溶液+50 μ M 1,4-ジチオエリスリトール)] を用いて、最小二乗法による一次回帰直線式から作成された。

4.13.2. 脂肪酸アシル CoA

上記と同様に、幼虫の凍結サンプルを調製した後、島津テクノリサーチに分析を委託した。まず、サンプルを 20 μ M tert-ブチルヒドロキノン／2：1 メタノール：クロロホルム混合溶媒中でホモジナイズした。遠心後に得られた上清を LC-MS/MS システムに注入した (カラム：Imtakt、Presto FF-C18、2.0 mm I.D. $\times$ 150 mm、2 μ m；溶媒 A：0.01% アンモニア；溶媒 B：アセトニトリル；溶媒 C：0.1% ギ酸／アセトニトリル；温度：40°C；流速：0.2 mL/分；走査：ポジティブ ESI)。検量線は、検量線用サンプルのピーク面積値 (20～1000 ng/mL C16:0 アシル CoA／20 μ M tert-ブチルヒドロキノン+50% メタノール) を用いて、最小二乗法による一次回帰直線式から作成された。

4.14. 統計解析

本研究でのレプリケートはすべてバイオロジカルレプリケートである。有意水準は、 P 値または補正 P 値 (FDR や *Bonferroni-adjusted P 値*) 0.05 未満とし

た。寿命アッセイ、メタボローム解析、RNA-seq 解析、CUT&RUN 解析の統計解析方法は、該当する図のレジェンドもしくは 4 章にそれぞれ記載している。それ以外の統計解析には R を用いた。箱ひげ図において、箱の最上端は第一四分位数、最下端は第三四分位数を示しており、中央の線は中央値を表している。ひげは、四分位数範囲の 1.5 倍以内にあるデータの最小値、あるいは最大値を示しており、四分位数範囲の 1.5 倍を超える場合は外れ値として扱われる。

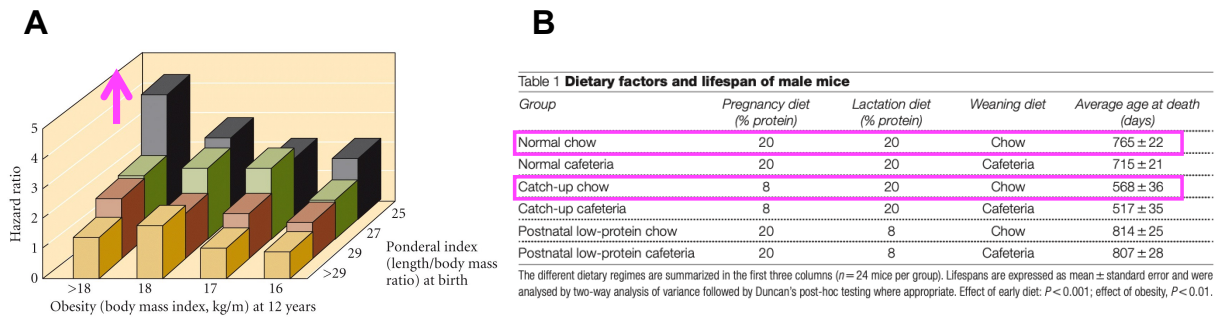


図 1. 成長期の栄養環境(栄養履歴)は成体にも長期的な影響を及ぼす

(A) 出生時の体が小さい、つまり胎児期に低栄養を経験し、かつ幼少期に肥満であった個体(ヒト)は、将来の冠動脈疾患になる危険性が増す。グラフの z 軸は冠動脈疾患のリスクを、y 軸は出生時における体長と体重の比、x 軸は 12 歳のときの肥満度を表している (Gilbert & Barresi, 2016 より抜粋)。(B) 妊娠期または授乳期の母マウス、あるいは離乳期の仔マウスに異なる食餌を与え、仔マウスの寿命を調べた結果。ピンクでハイライトした 2 条件は、妊娠期の母マウスに、標準的食餌あるいは低タンパク質食餌を与え、その後の食餌は標準的な食餌を与えた場合である。仔マウスの寿命は、胎児期に低タンパク質食餌を経験した方で短くなった (Ozanne & Hales, 2004)。

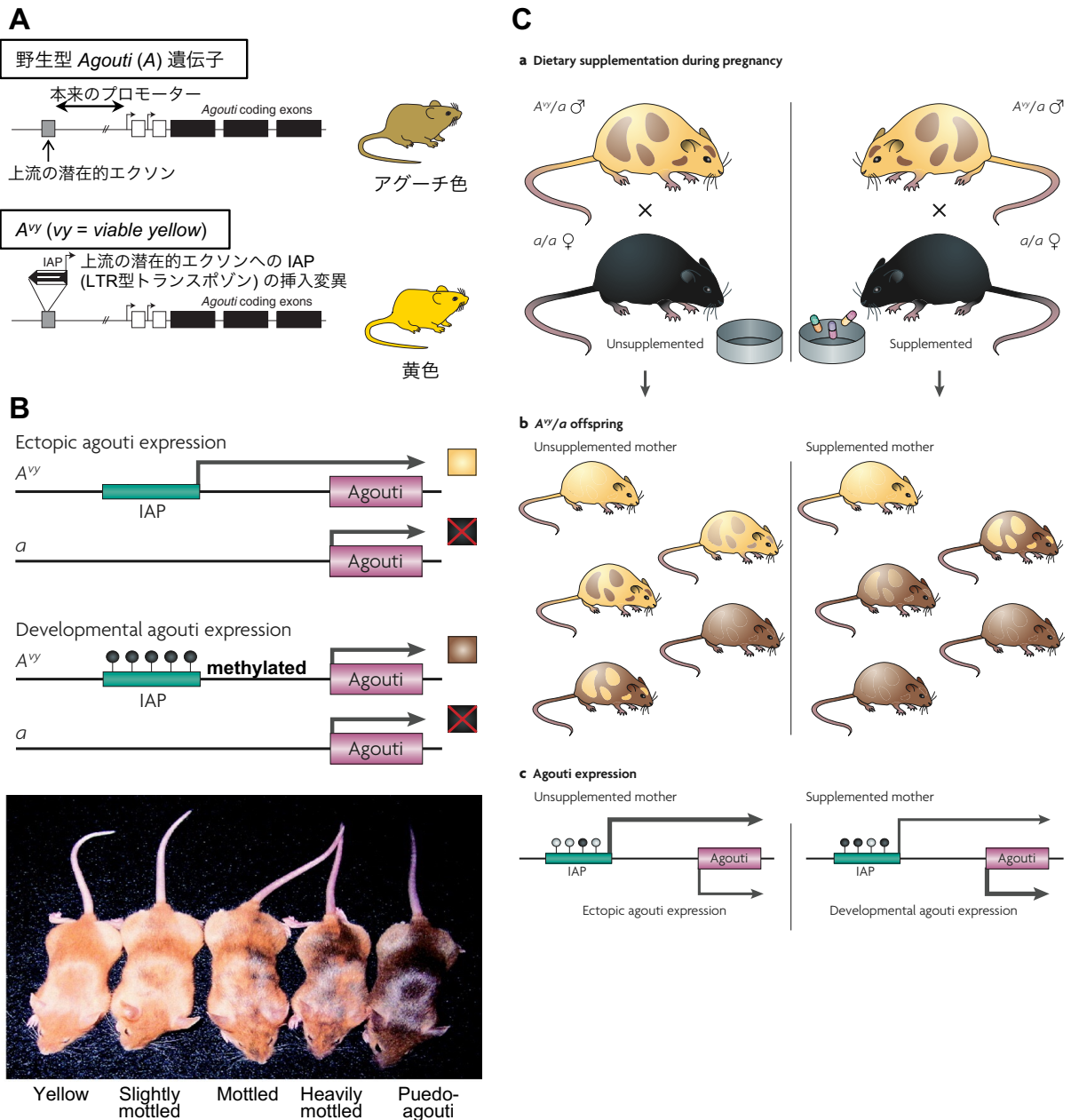


図 2. 栄養履歴がエピジェネティック制御を介し、後期形質の発現に影響を与える

(A) 野生型 *Agouti* (*A*) 遺伝子を持つマウスの毛色はアグーチ色になる。一方で、変異アリル *Agouti variable yellow* (A^{vy}) がユビキタスに発現されると、毛色は黄色になる (Blewitt & Whitelaw, 2013 より改変)。(B) A^{vy} とヌルアリル a とのヘテロ接合型の A^{vy}/a マウスの毛色は A^{vy} IAP サイトのメチル化レベルと相関し、低メチル化では黄色を、高メチル化では pseudo-agouti 色を呈する (Waterland & Jirtle, 2003)。(C) メチルドナー (葉酸、コリン、ビタミン B₁₂、ベタイン) を増量した栄養履歴を胎児期に経験した A^{vy}/a マウスは、コントロールと比べて、pseudo-agouti 色を示す確率が高くなり、 A^{vy} IAP サイトを見るとメチル化レベルも上昇している (Jirtle & Skinner, 2007)。

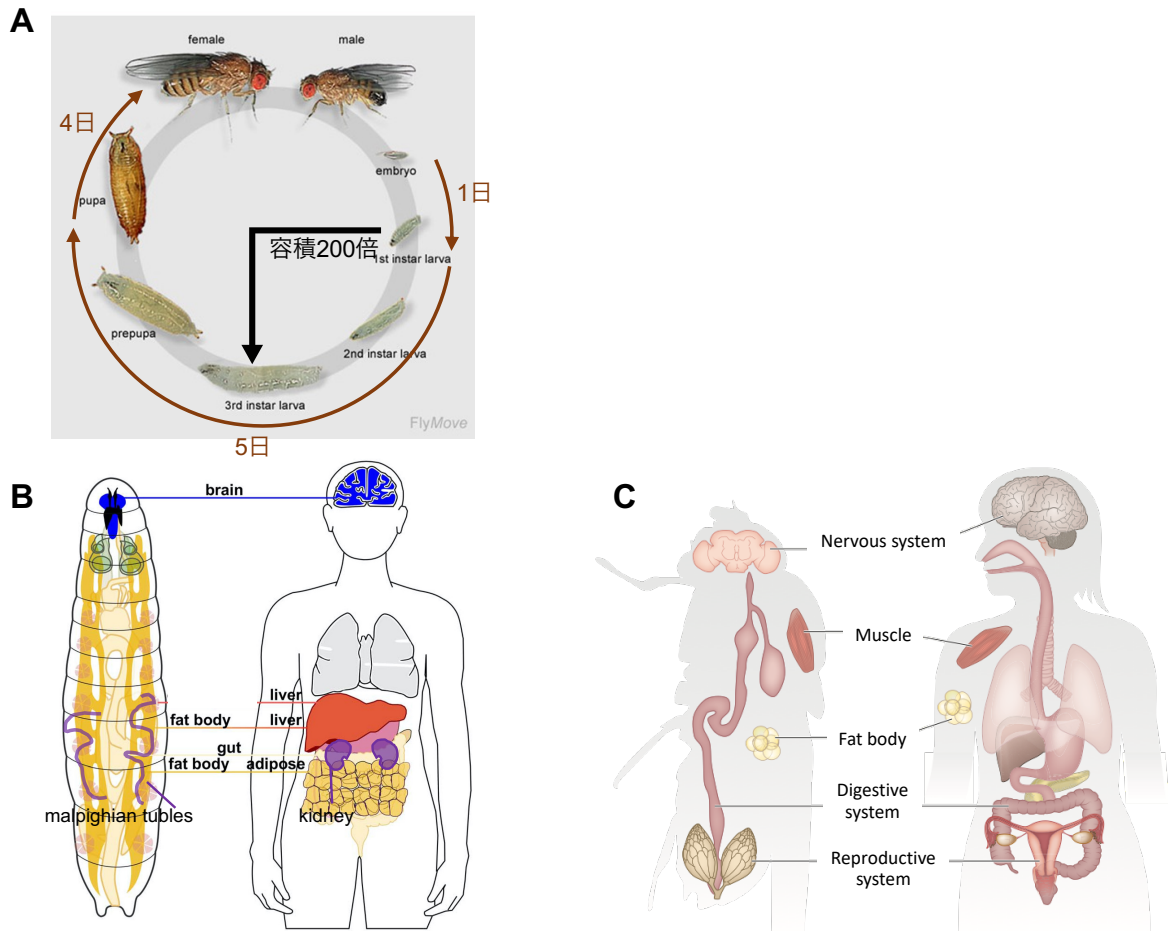


図 3. モデル生物キロショウジョウバエ

(A) キロショウジョウバエの生活環

(<https://www.flickr.com/photos/11304375@N07/2993342324> より改変)。茶色の矢印と数字は、25°Cで実験質標準餌を与えて飼育した場合に要する日数を示す。孵化直後から2回脱皮し、最終齢の3齢幼虫へと発生する。3齢幼虫は前期と後期に大別され、後期になると摂食行動を止めて、餌外区域を這い回る。この成長過程において、容積はおよそ200倍に増大する。**(B と C)** キロショウジョウバエの幼虫または成虫と、ヒトを含む哺乳類の間では、多くの器官が保存されている (Gillette et al., 2021 より改変; Droujinine & Perrimon, 2016)。

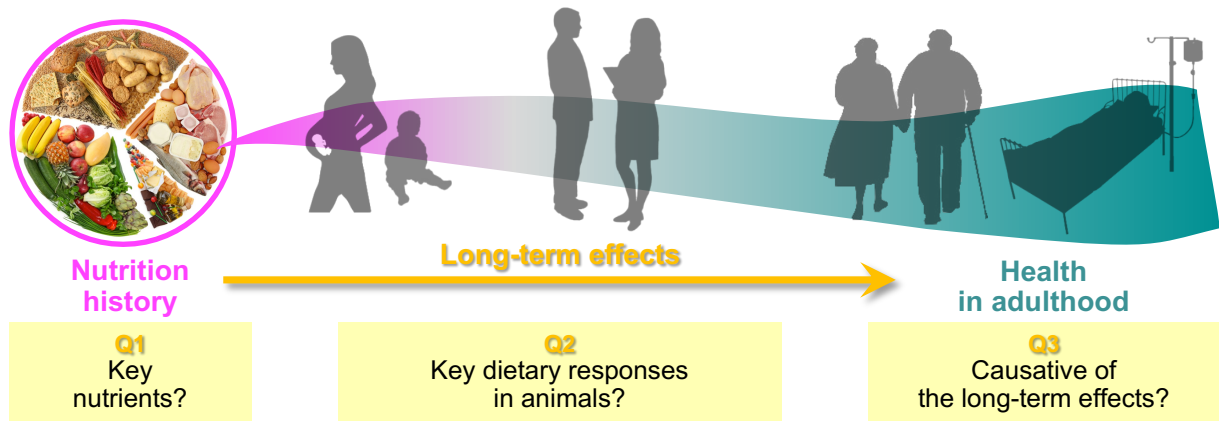


図 4. 本研究の目的とクエスチョン

本研究は、栄養履歴（Nutrition history）が成長期を越えて、成体の後期形質まで長期的な影響を与える機構を解明することを目指した。そこで、寿命に影響を与える食餌の特性（Q1）と、その餌を食べた個体の生体応答（Q2）、そして、栄養履歴や生体応答、長期的影響の間の因果関係（Q3）のクエスチョンを軸に、研究を進めた。

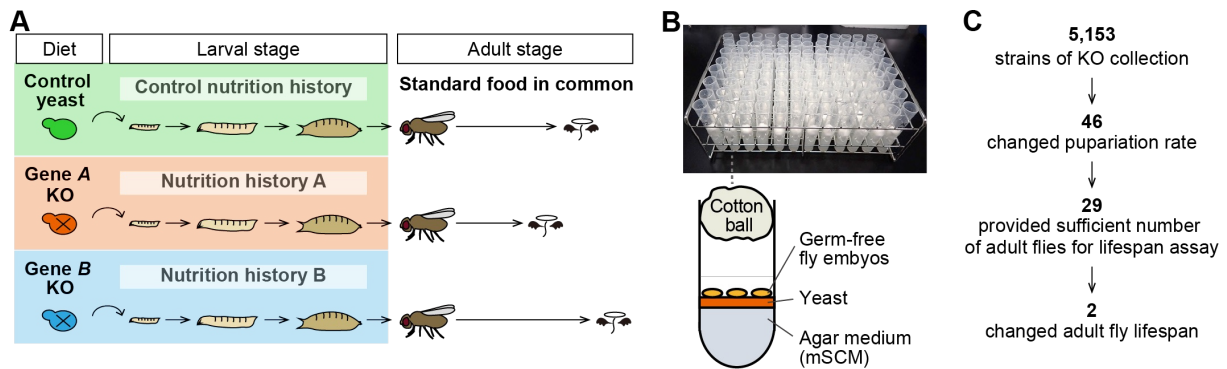


図 5. 寿命を変える栄養履歴のスクリーニングの実験系

(A) 寿命を変える栄養履歴を探索するための実験系。異なる栄養履歴を持ったキイロショウジョウバエの成虫を得るために、まず幼虫に出芽酵母の単一遺伝子変異株それぞれまたはコントロール酵母株を餌として与え（live yeast-fly assay）、成虫に発生した以降は共通して実験室標準餌を与えた。例えば、遺伝子 A の酵母変異株を幼虫期に食べて発生した成虫（栄養履歴 A）はコントロールより寿命が短くなり、遺伝子 B の酵母変異株を幼虫期に食べて発生した成虫（栄養履歴 B）はコントロールより寿命が長くなる。このような栄養履歴 A または B を探索した。(B) Live yeast-fly assay の写真と模式図。まずチューブ中の寒天培地（mSCM）上で、酵母変異株それぞれを培養し、そこに無菌化したショウジョウバエ胚 30 個を投入し、綿球で蓋をした（4.3.）。孵化した幼虫は、生酵母細胞と mSCM の両方を食べて、成虫へと発生する。寿命アッセイに必要な成虫数を稼ぐため、同じ酵母変異株餌について、複数のレプリケートを用意し、実験を行った。(C) 酵母変異株餌の探索結果。まず、全 5,153 株の酵母株のうち、幼虫に餌として与えたとき、蛹までの発生率が低下するか、または発生が遅延する 46 株を分離し（高橋, 2017）、さらに、寿命アッセイに十分な数の成虫が得られる 29 株を選択した（表 1）。そしてこれら 29 株から、成虫の寿命を短縮する酵母株である *nat3* 遺伝子ノックアウト株 (*nat3Δ*)、延長する酵母株である *brp1* 遺伝子ノックアウト株 (*brp1Δ*) を分離した。一連のスクリーニングにおいて、キイロショウジョウバエ系統を 2 種用いた。酵母 29 株の絞りこみまでは、*Canton-Special* (CS) を使用し（Watanabe et al., 2019；Mure et al., 2023）、2 株の分離に至った寿命アッセイでは *white Dahomey* (wDah) を使用した（Grandison et al., 2009；Slack et al., 2015）。

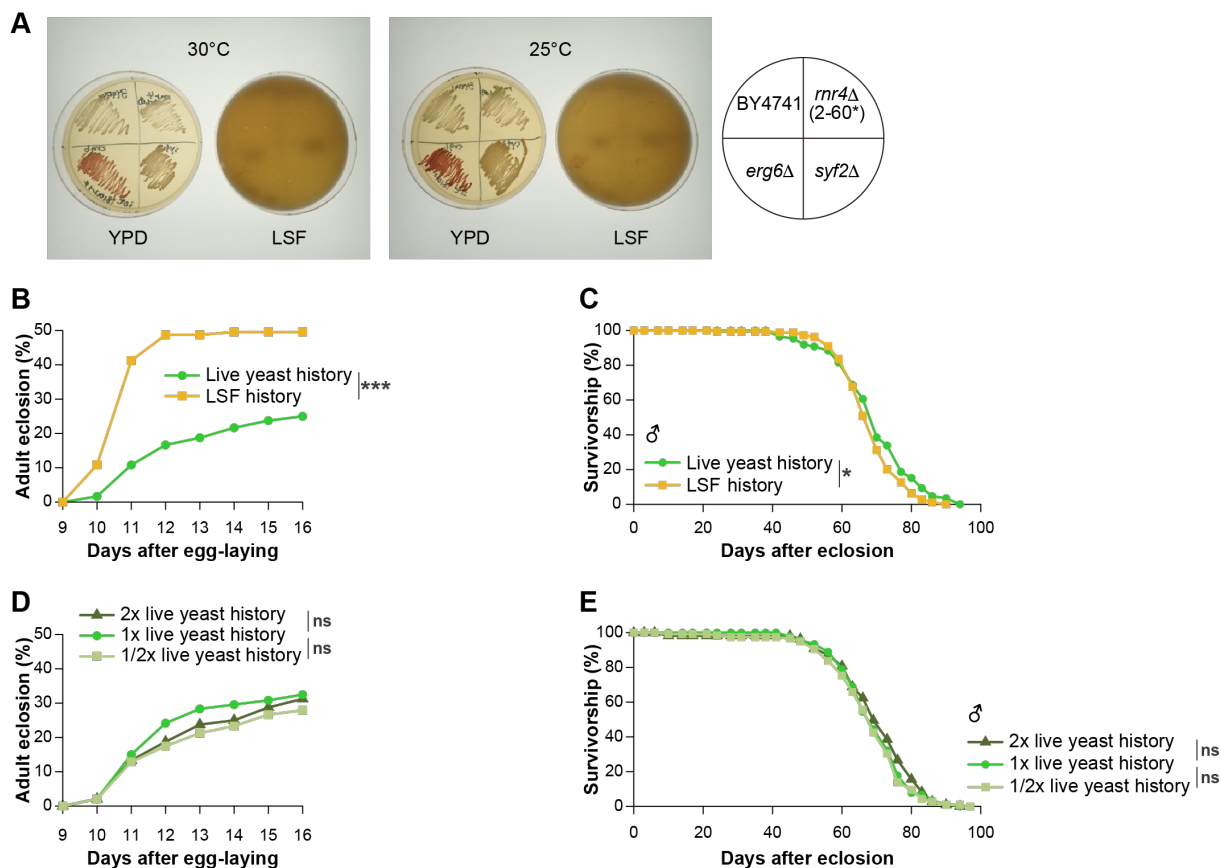


図 6. Live yeast-fly assay の特徴

(A) 酵母変異株をそれぞれ Yeast extract peptone dextrose (YPD) 培地と実験室標準餌上で、30 °Cで 2 日間培養した写真 (左)、あるいは 25 °Cで 7 日間培養した写真 (右)。酵母株では YPD 上では増殖したが、防腐剤が含まれる実験室標準餌上 (4.2.) では増殖しなかった。右の模式図は培養に用いた酵母株の名称とプレート上での位置を示している。(B と C) 幼虫期に与える、コントロール酵母株餌 (“Live yeast history”) と実験室標準餌 (“LSF history”) の比較。(B) 各成虫の羽化数を数え、雌雄をまとめて発生率 (%) を算出し、その平均値を経時的にプロットした。(C) それぞれの成虫について、共通に実験室標準餌を与え、寿命を調べた。(D と E) 幼虫期に与える、コントロール酵母株餌の酵母量を増減させた結果。基本のコントロール酵母株の初期量 (1x: $\sim 8 \times 10^8$ cells/mL) よりも半分に減らした (1/2x)、あるいは倍に増やした (2x)。成虫までの発生 (D) と寿命 (E) とともに、条件間で差は見られなかった。

ns : not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。

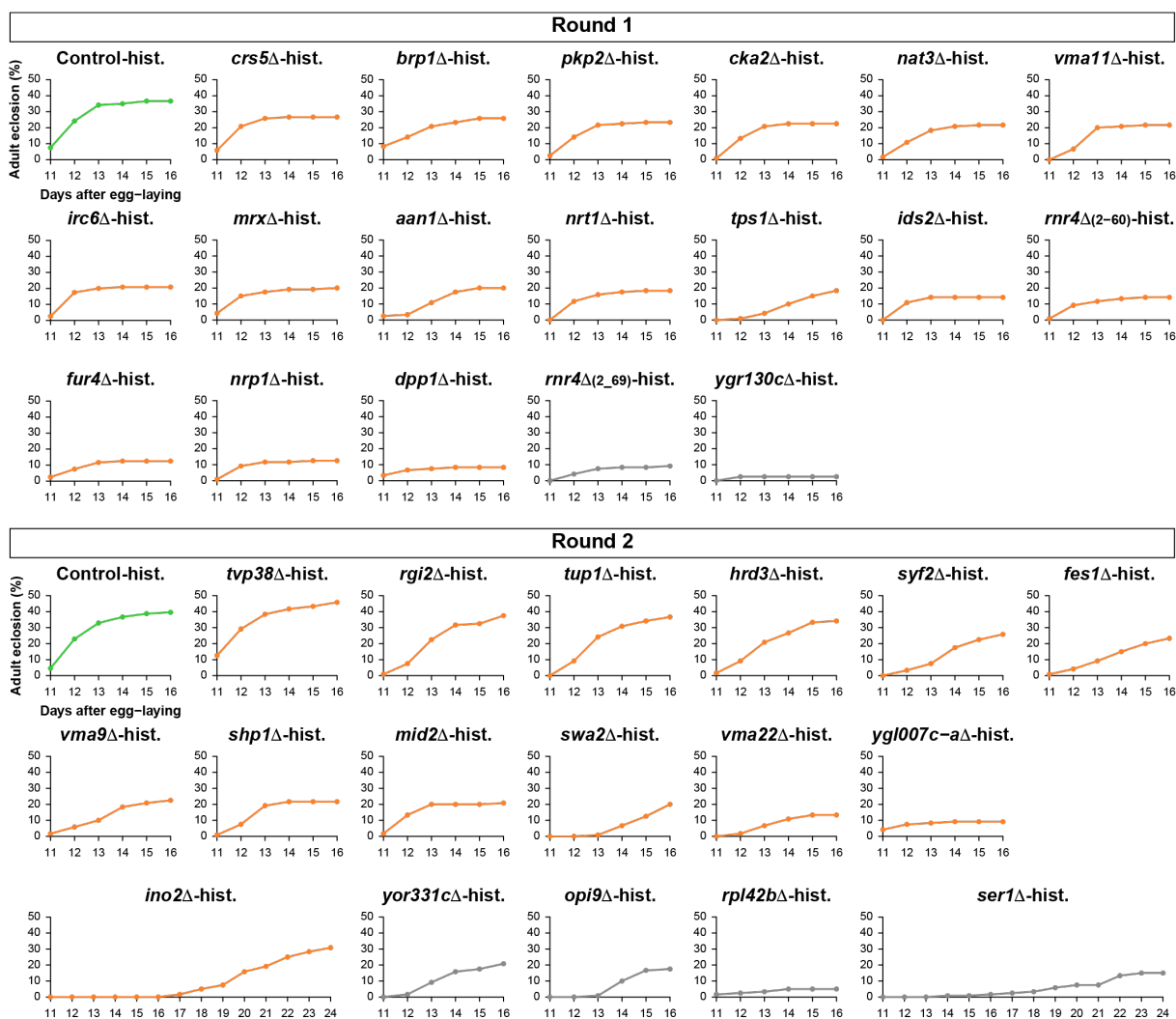


図 7. 酵母株餌履歴を持つ成虫の発生

Live yeast-fly assay において、各酵母株餌を食べた幼虫が成虫まで発生した割合を経時的に追った結果。酵母株 46 株のうち 11 株はほとんど蛹が出ない株であり、これらを除いた 35 株について、幼虫に餌として与え、成虫の発生を調べた。この実験は計 2 回に分けて行った (Round 1 と Round 2)。35 株のうち、寿命アッセイに必要な数の成虫を容易に得ることができる 29 株を選択し (橙色)、6 株を除いた (灰色)。なお、ここで用いたキイロショウジョウバエ系統は CS である。以上の結果を表 1 にまとめた。

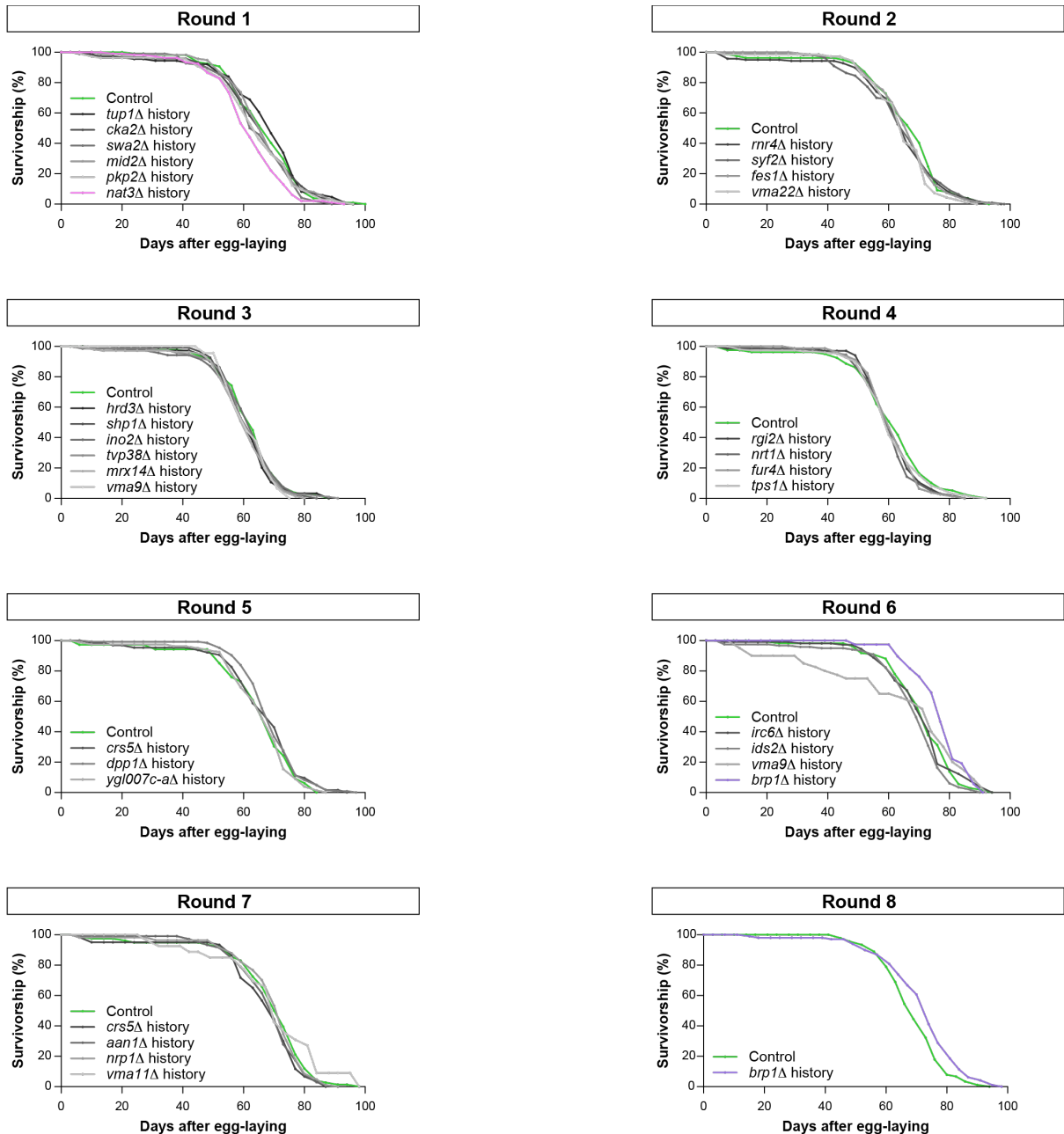


図 8. 酵母株餌履歴を持つ成虫の寿命アッセイの結果

29 の酵母株餌を幼虫に与え、発生した成虫の寿命を調べた。各回、コントロールの生存曲線は緑色で、それぞれのコントロールと比べて差があった *nat3Δ* 栄養履歴と *brp1Δ* 栄養履歴をそれぞれピンク色と紫色で、そして差がなかった生存曲線を灰色で示している。

解析結果の詳細は表 2 または表 12 を参照。

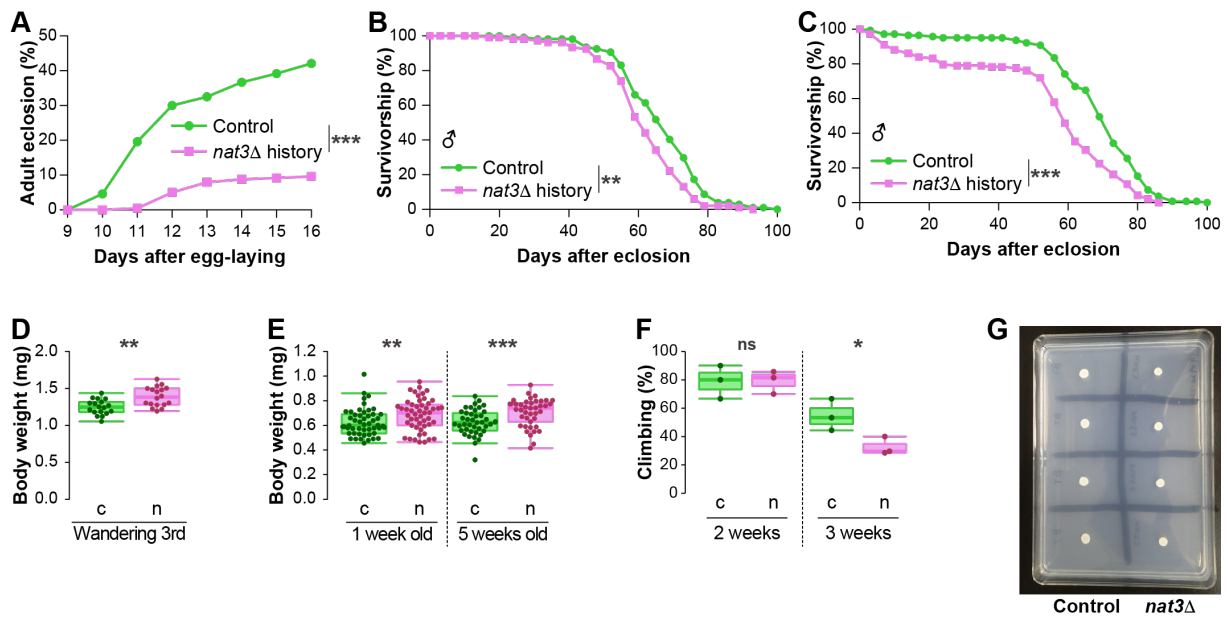


図 9. 寿命短縮を含む、*nat3Δ* 栄養履歴を持つ個体の多様な表現型

(A) コントロール個体と *nat3Δ* 栄養履歴を持つ個体における、幼虫から成虫までの発生結果。各条件において、羽化率（胚数に対する雌雄の成虫の羽化数）の平均値をプロットした。(B と C) コントロール成虫と *nat3Δ* 栄養履歴を持つ成虫の寿命。B は図 8 の Round 1 から抜粋した結果であり、C は再現性を検証するために行った結果であり、両者は独立の試行である。これら以外にも 10 回試行し、いずれでも *nat3Δ* 栄養履歴の寿命短縮は再現された（データは示さない）。(D と E) コントロール個体（“c”）と *nat3Δ* 栄養履歴を持つ個体（“n”）の体重。パネル D は幼虫の体重であり、13~15 匹ごとに体重を測定し、その平均値をプロットした（18 replicates）。パネル E は 1 週齢または 5 週齢の成虫の体重を、個体ごとに測定した結果である。(F) コントロール成虫（“c”）と *nat3Δ* 栄養履歴を持つ成虫（“n”）の運動能。2 週齢では両者に差がないものの、3 週齢では *nat3Δ* 栄養履歴を持つ個体の運動能が低下した。(G) mSCM 寒天培地上での、コントロール酵母（“c”）あるいは *nat3Δ* 酵母（“n”）の増殖の様子。Yeast-fly アッセイ手順に従って調製した懸濁液それぞれ 5 μ l を培地にスポットし、30°C、2 日間培養した。増殖度に大きな差は見られなかった。

ns : not significant、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

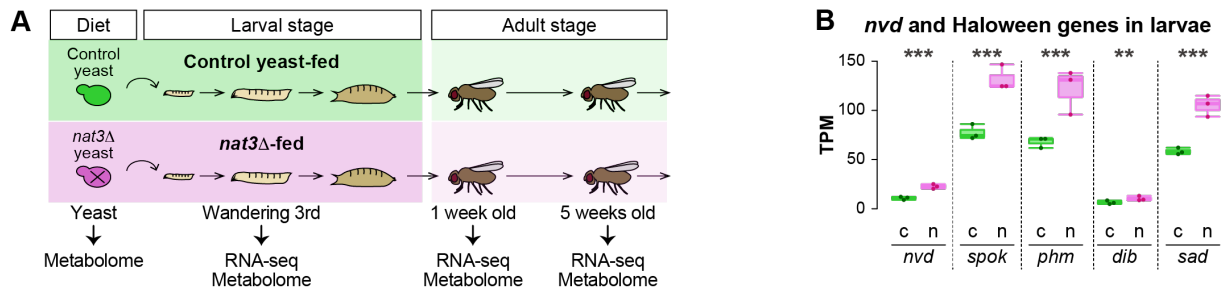


図 10. *nat3Δ* 栄養履歴の寿命短縮機構を追究するためのオミクス解析

(A) 模式図の各タイムポイントにおいて、酵母や、ショウジョウバエの幼虫あるいは成虫をサンプリングし、オミクス解析を行った。ショウジョウバエ全身を用いた RNA-seq 解析において、後期 3 齢幼虫では、1120 (*nat3Δ* 餌摂取によって 693 上昇、427 低下) の発現変動遺伝子、1 週齢の成虫では 223 (*nat3Δ* 栄養履歴によって 121 上昇、102 低下) の発現変動遺伝子、5 週齢の成虫では 165 (*nat3Δ* 栄養履歴によって 39 上昇、126 低下) 発現変動遺伝子が分離された。(B) コントロール幼虫 (“c”) または *nat3Δ* 餌を食べた幼虫 (“n”) における *neverland* (*nvd*) と、Halloween genes と呼ばれる 4 遺伝子である *spookier* (*spok*)、*phantom* (*phm*)、*disembodied* (*dib*)、*shadow* (*sad*) の発現値 (RNA-seq 解析データ)。これらの遺伝子は、エクジソンホルモン (蛹化ホルモン) の生合成経路を触媒する酵素をコードしている。さらに、Gcn5 や Ada2a をサブユニットとして持つヒストンアセチル化複合体 ATAC によって、発現制御を受けることが知られている (Niwa & Niwa, 2016)。そこで我々は Gcn5 や Ada2a に着目した。ただし先行研究では、Halloween genes は *Ada2a* 変異体において発現低下しており、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫とは逆方向の変動を示した。実際に Halloween genes は、図 11C において、左カラム ($\log_2(\text{nat3}\Delta\text{-fed/control})$) が赤、右カラム ($\log_2(\text{Ada2a}^{-}/\text{control})$) が青である部分にクラスタリングされた。

** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

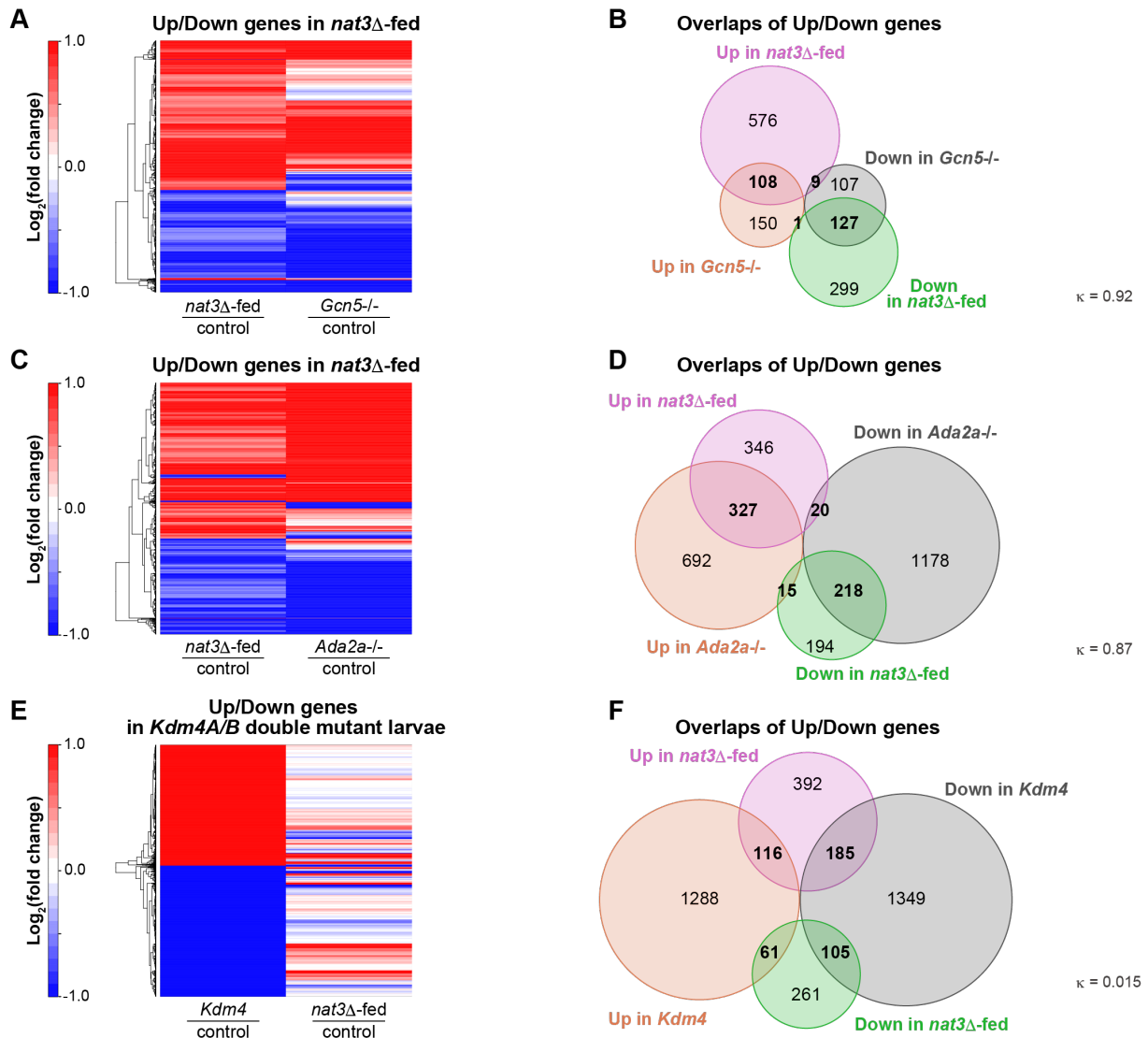


図 11. *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の遺伝子発現変動と、ヒストンアセチル基転移酵素変異体の遺伝子発現変動は似ている

(A と B) *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の RNA-seq データと、*Gcn5* 変異体幼虫のマイクロアレイデータ (Carré et al., 2008) の比較。(A) 遺伝子発現変動値 (左: $\log_2(\text{nat3}\Delta\text{-fed/control})$ 、右: $\log_2(\text{Gcn5}^{-/-}/\text{control})$) を示したヒートマップ。*nat3Δ* 餌摂取により有意に発現変動した遺伝子に絞り、クラスタリング解析を行った。(B) 各条件について、コントロールよりも有意に発現が上昇 (“Up”) または低下 (“Down”) した遺伝子のベン図。重複していた遺伝子数は太字にしており、それら 4 つの数字を用いて、相関度の指標であるカッパ係数 (κ) を算出した。(C と D) *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の RNA-seq データと *Ada2a* 変異体幼虫のマイクロアレイデータ (Carré et al., 2008) の比較。(E と F) *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の RNA-seq データと *Kdm4A/Kdm4B* (“*Kdm4*”) 変異体幼虫のマイクロアレイデータ (Tsurumi et al., 2019) の比較。*Kdm4A* と *Kdm4B* はヒストン H3K9 および H3K36 の脱トリメチル化酵素である (Lloret-Illinares et al., 2008)。

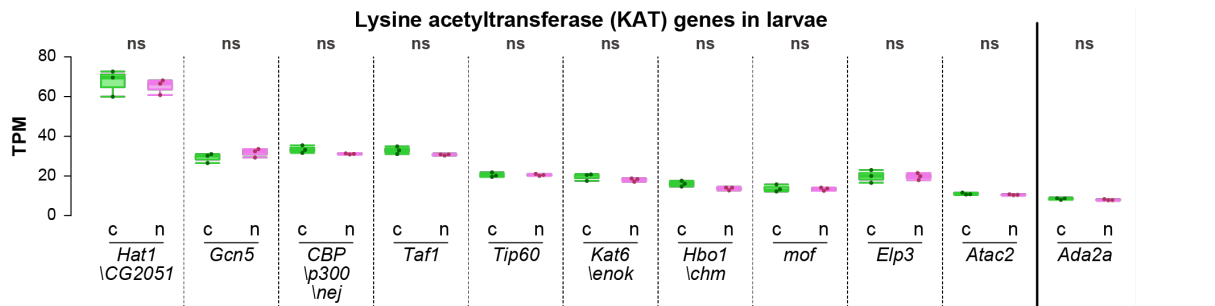


図 12. リジンアセチル化酵素群(KATs)の発現は *nat3Δ* 餌による影響を受けない

コントロール (“c”)、および *nat3Δ* 餌を食べた幼虫 (“n”) における、Gcn5 を含むリジンアセチル化酵素群 (KATs ; Feller et al., 2015) と Ada2a の遺伝子発現値 (RNA-seq 解析データ)。

ns : not significant. テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

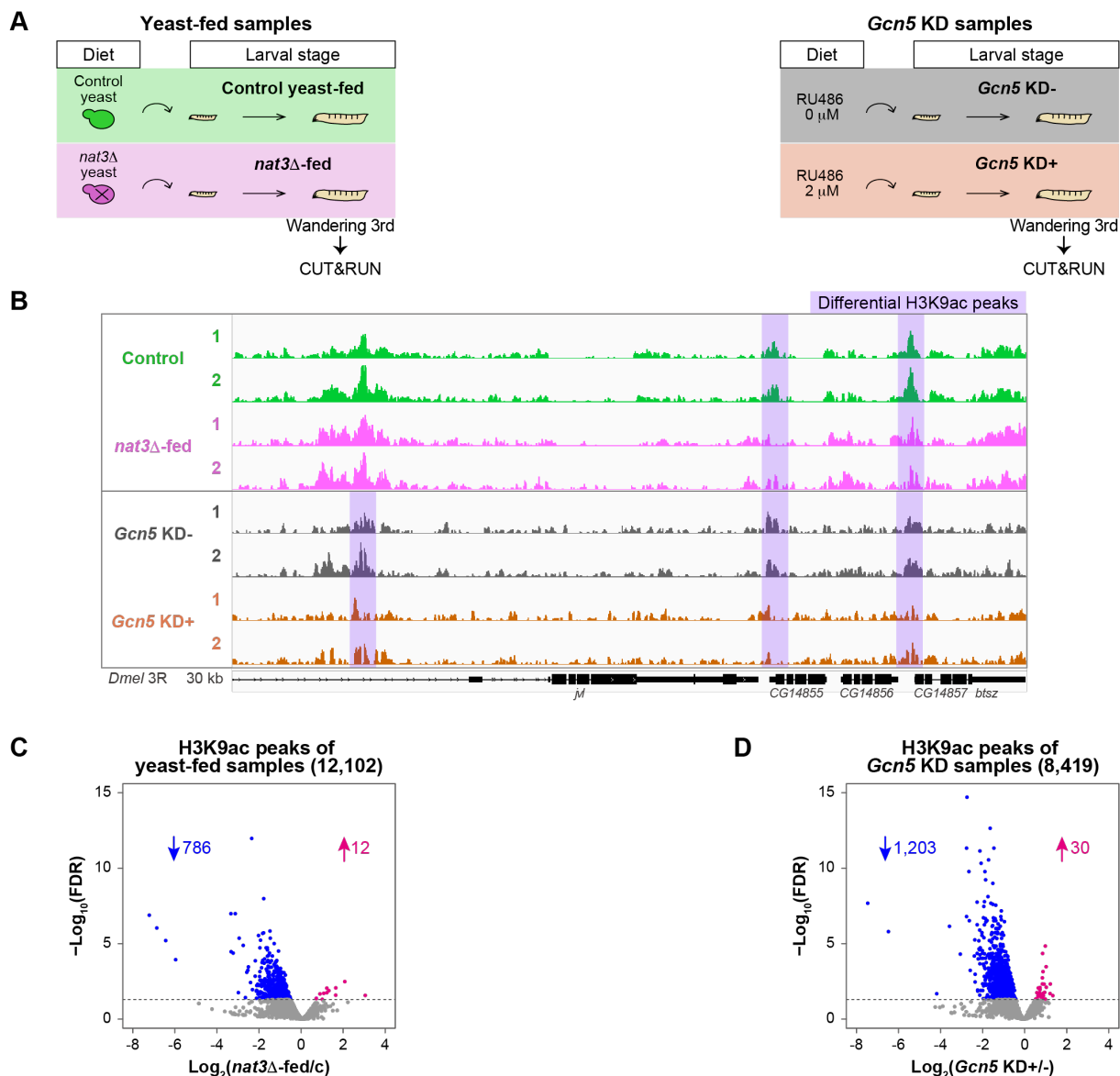


図 13. *nat3Δ* 餌を食べた幼虫ではヒストンアセチル化が低下していた

(A) ゲノムワイドにヒストンアセチル化を調べる CUT&RUN 実験 (Skene & Henikoff, 2017) のデザイン。1 組目は、コントロールと *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の全身を用いた解析である (左)。2 組目は、コントロールと *Gcn5* を全身でノックダウンした後期 3 齢幼虫を用いた解析である (右)。GeneSwitch システムを用いると、薬剤 RU486 を実験室標準餌に混ぜて与えるか否かにより、*Gcn5 shRNA* の発現を制御できる (図 14)。(B) 一部のゲノム域の CUT&RUN 解析結果。*Gcn5* のターゲットの 1 つはヒストン H3K9 であり、そのアセチル化 (H3K9ac) 特異的なピークを Integrative Genomics Viewer (IGV) により表示した。紫の影付き域は、コントロールと比べて *nat3Δ* 餌摂取あるいは *Gcn5* ノックダウンによる、有意な H3K9ac 変動が見られたピークである。(C と D) H3K9ac ピークの volcano プロット。*nat3Δ* 餌摂取 (C) あるいは *Gcn5* ノックダウン (D) それぞれにより、コントロールと比べて有意に ($P < 0.05$; 詳細は 4.11.2. を参照) H3K9ac レベルが上昇または減少したピークを、マゼンタ色または青色のデータポインターで示している。変動しなかったピークは灰色で示した。

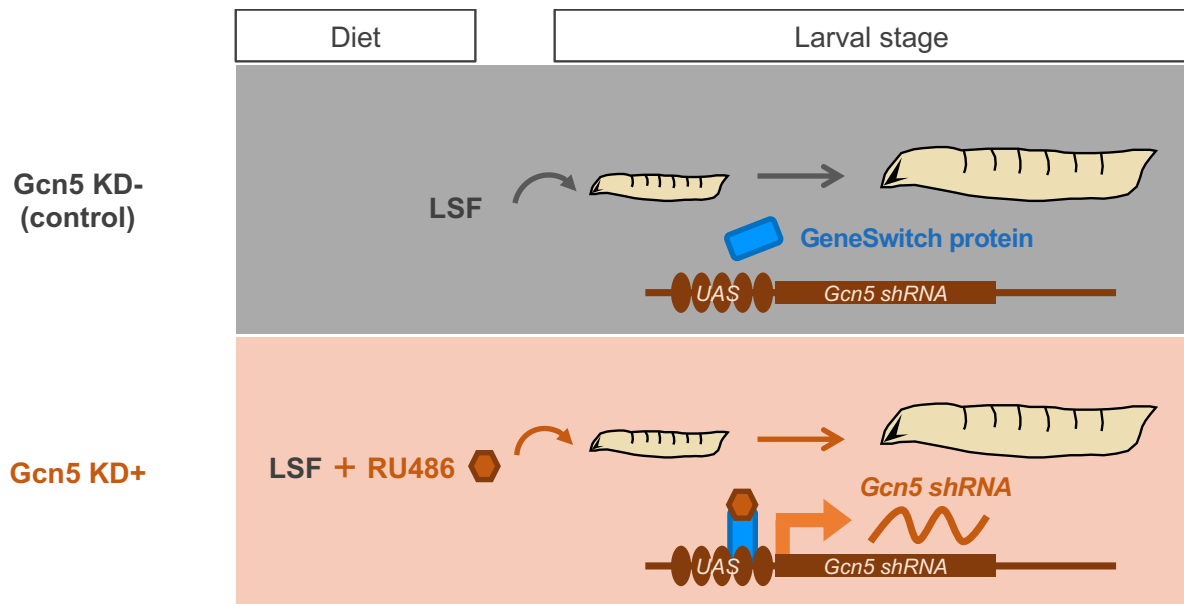


図 14. GeneSwitch システムによる *Gcn5* ノックダウン

GeneSwitch ドライバー（ここでは、全身において発現誘導ができる *daughterless GeneSwitch* (*DaGS*))、*UAS* 配列と目的の遺伝子配列（ここでは、*Gcn5* の短ヘアピン RNA：*shRNA*）を持つ幼虫を用意する。（上段）この幼虫に実験室標準餌（LSF）を与えても、*GeneSwitch* タンパク質は *UAS* 配列にほとんど結合せず、*Gcn5 shRNA* は発現されない。（下段）一方、薬剤 RU486 が存在すると、*GeneSwitch* タンパク質が *UAS* 配列に結合し、*Gcn5 shRNA* は発現される。したがって *GeneSwitch* システムを利用すると、同じ遺伝子型の個体について特定の遺伝子の発現を制御することができる。

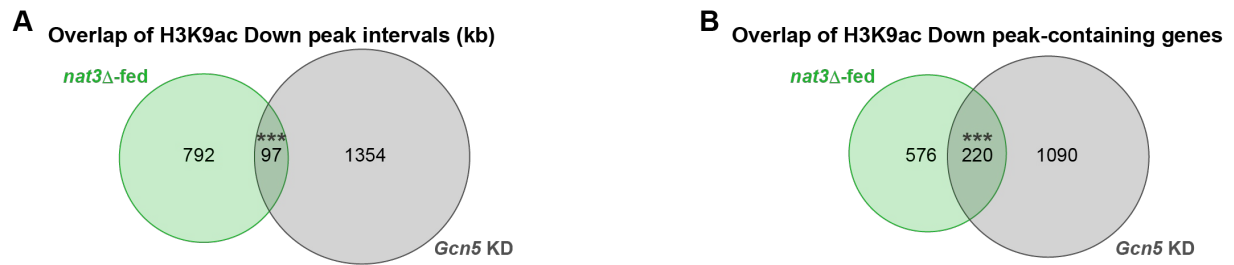


図 15. *nat3Δ* 餌摂食によるヒストンアセチル化低下と、*Gcn5* ノックダウンによるヒストンアセチル化低下の一部は、近接したゲノム域で起こっている

(A) H3K9ac 低下ピークの裾野長の合計値 (kb) のベン図。*nat3Δ* 餌摂食による H3K9ac 低下ピークと、*Gcn5* ノックダウンによる H3K9ac 低下ピークは有意に重なっていた。

(B) H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子のベン図。両者の間で、H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子は有意に共通していた。

*** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。

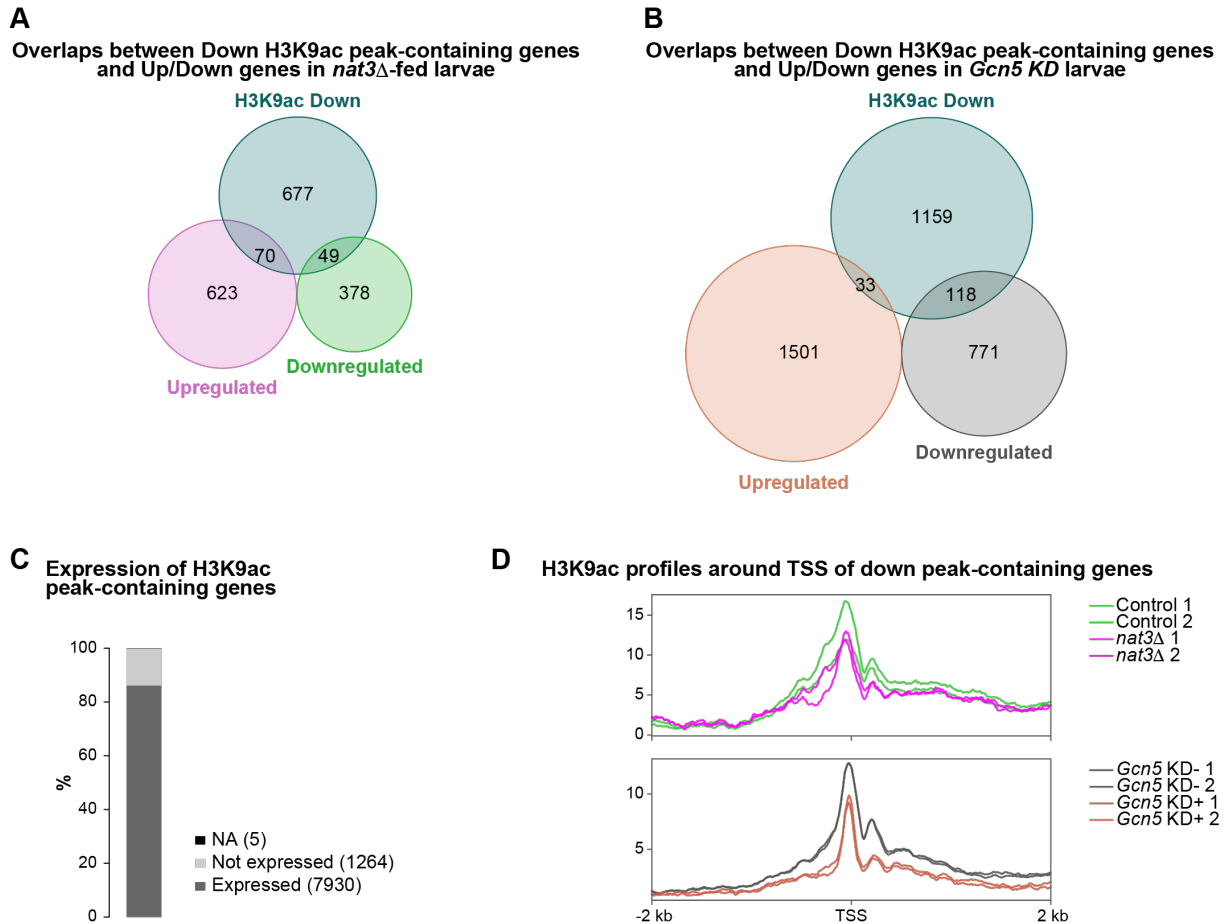


図 16. ヒストンアセチル化と遺伝子発現の関係

(A と B) H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子と発現変動遺伝子のベン図。*nat3Δ* 餌摂取でも (A)、*Gcn5* ノックダウンでも (B)、H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子と発現変動遺伝子の間に、大きな重複は見られなかった。(C) *nat3Δ* 餌を食べた幼虫における H3K9ac ピークを含む遺伝子について、その発現の有無を調べた結果。全 H3K9ac ピークを含む 9,199 遺伝子のうち、7,930 遺伝子 (86%) が発現しており (“Expressed”)、1,264 遺伝子が発現していなかった (“Not expressed”)。残りの 5 遺伝子 (*His3:CG33866*、*His3.3A*、*His3.3B*、*His4r* および *DIP1*) は RNA-seq アノテーション一覧にない遺伝子である (“NA”)。(D) 転写開始点 (TSS) 付近における H3K9ac の分布。上段は、コントロール酵母餌を食べた幼虫 (“Control”) と *nat3Δ* 餌を食べた幼虫 (“*nat3Δ*”) の各レプリケート 1 と 2、下段は、*Gcn5* をノックダウンしていない (コントロール) 幼虫 (“*Gcn5 KD-*”) とノックダウンした幼虫 (“*Gcn5 KD+*”) の各レプリケート 1 と 2 である。

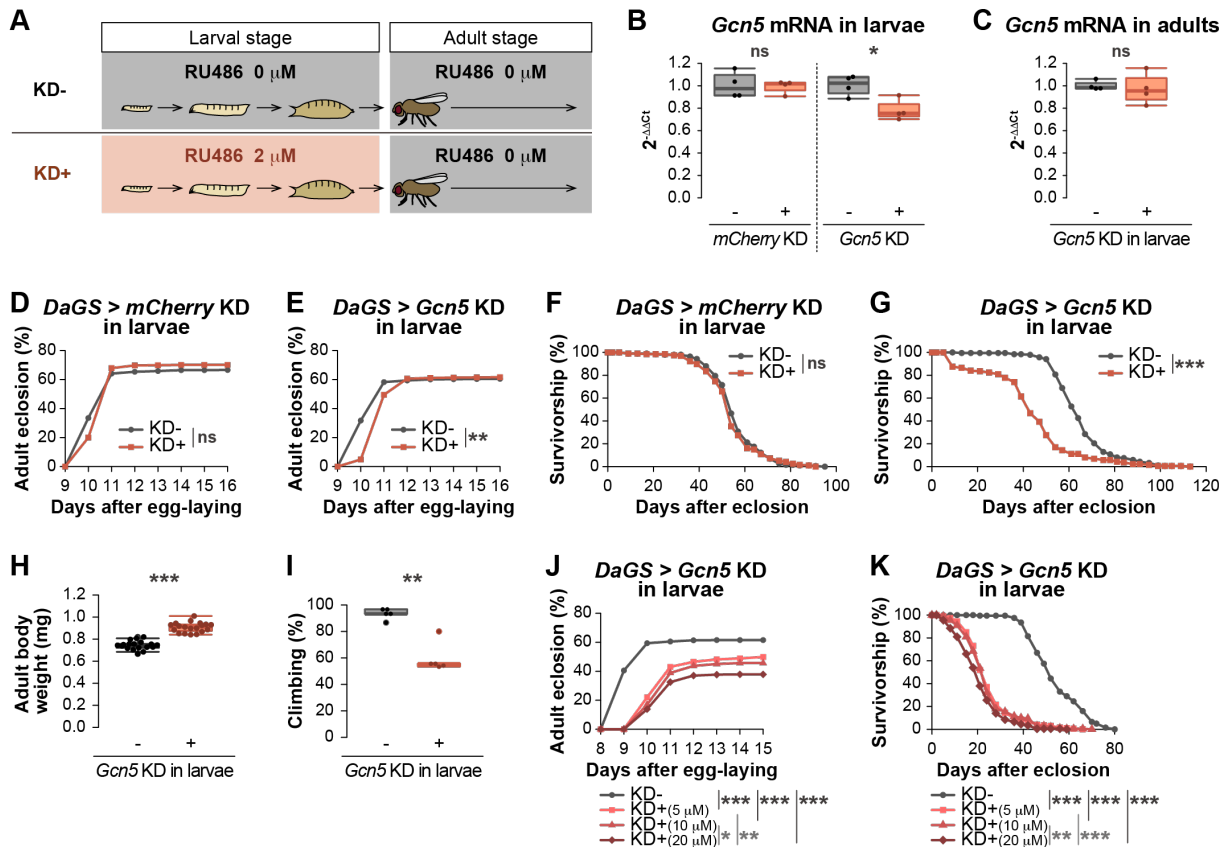


図 17. 全身での *Gcn5* ノックダウン履歴がもたらす長期的影響

(A) ノックダウン履歴を作るための実験デザイン。コントロールの幼虫には薬剤 RU486 無しの実験室標準餌を与えて、成虫まで発生させ、ノックダウンの幼虫には RU486 含有（特筆しない限り濃度は 2 μ M）の餌を与えて発生させた。成虫期以降は共通に RU486 無しの餌で飼育した。(B) 幼虫全身における *Gcn5* の発現量を RT-qPCR により調べた結果。遺伝子型 (*DaGS > mCherry RNAi* または *DaGS > Gcn5 RNAi*) ごとに、RT-qPCR を分けて行い、コントロール幼虫 (“-”) とノックダウン幼虫 (“+”) を比較した。mCherry は人工蛍光タンパク質。各ポイントは、ハウスキープ遺伝子 *rp49* の発現量に対する *Gcn5* の相対発現量を示している。(C) コントロールの成虫 (“-”) と幼虫期に *Gcn5* ノックダウン履歴を持つ成虫 (“+”) の全身における *Gcn5* mRNA 量を RT-qPCR により調べた結果。用いた成虫は、遺伝子型 *DaGS > Gcn5 RNAi* であり、1 週齢である。(D と E) *Gcn5* ノックダウンが、幼虫から成虫までの発生に及ぼす影響。遺伝子型 *DaGS > mCherry RNAi* (D) または *DaGS > Gcn5 RNAi* (E) において、それぞれコントロール個体 (“KD-”) とノックダウン個体 (“KD+”) の発生を比較した。各条件において、羽化率（胚数に対する雄雌の成虫の羽化数）の平均値をプロットした。(F と G) *Gcn5* ノックダウン履歴が、成虫の寿命に及ぼす影響。遺伝子型 *DaGS > mCherry RNAi* (F) または *DaGS > Gcn5 RNAi* (G) において、それぞれコントロール個体 (“KD-”) とノックダウン個体 (“KD+”) の寿命を比較した。(H) *Gcn5* ノックダウン履歴を持つ成虫の体重。遺伝子型 *DaGS > Gcn5 RNAi* の 1 週齢の成虫について、コントロール個体 (“KD-”) とノックダウン個体 (“KD+”) の体重を個体ごとに測定した。(I) *Gcn5* ノックダウン履歴を持つ成虫の運動能力。遺伝子型 *DaGS > Gcn5 RNAi* の 2 週齢の成虫について、コントロール個体 (“KD-”) とノックダウン個体 (“KD+”) の運動能をレプリケートごとに測定した。(J と K) より強い *Gcn5* ノックダウン履歴の影響。

遺伝子型 *DaGS > Gcn5 RNAi* において、コントロール個体 (“KD-”) と、ノックダウン個体を 3 条件用意し、幼虫から成虫までの発生 (J) と成虫の寿命 (K) を調べた。パネル A-I より強い *Gcn5* ノックダウンを誘導するため、RU486 の濃度をそれぞれ 5 μ M、10 μ M、20 μ M とした。

ns : not significant、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

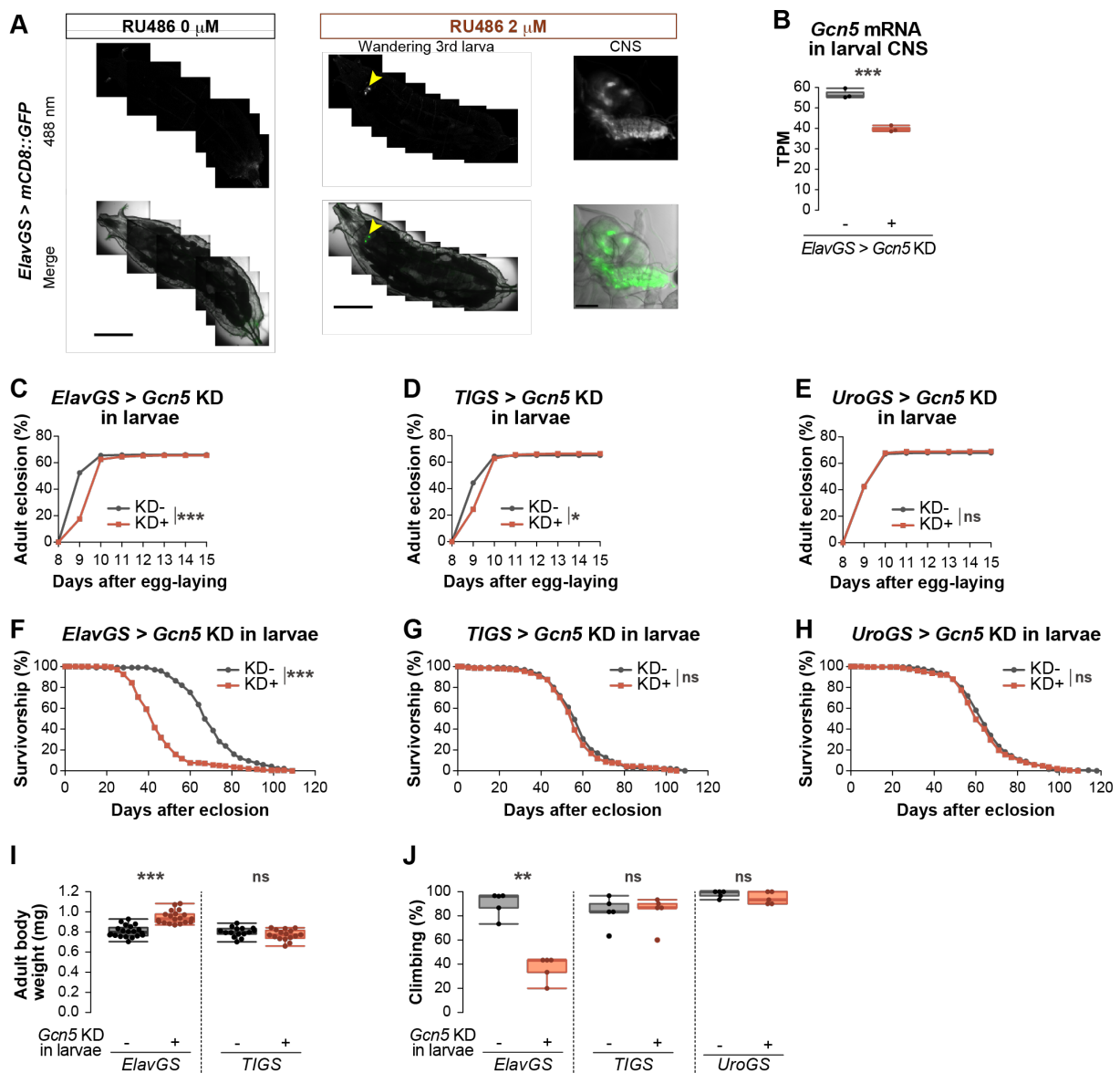


図 18. 組織特異的な *Gcn5* ノックダウン履歴による影響

(A) 神経系特異的な *GeneSwitch* ドライバー (*ElavGS*) による、膜結合型蛍光タンパク質 (mCD8::GFP) の発現誘導を、幼虫において調べた結果。左の 2 図は、薬剤 RU486 による発現誘導を行わなかったコントロールの幼虫全身であり、中央の 2 図は 2 μ M RU486 を与えたときの幼虫の全身であり、黄色の矢尻は中枢神経系 (CNS) を指している。右の 2 図は、発現誘導した幼虫を解剖して、CNS をより高倍で捉えた画像である。また、上段と下段はそれぞれ、488 nm のシングルチャンネル、下段は 488 nm チャンネルと透過光チャンネルを重ね合わせた同一個体および CNS である。スケールバーについて、幼虫全身では 1,000 μ m (左と中央)、CNS のみでは 100 μ m (右) を表している。(B) 遺伝子型 *ElavGS > Gcn5 RNAi* である、幼虫の CNS について、*Gcn5* mRNA 量を調べた結果。コントロール (“-”) およびノックダウン個体 (“+”) の CNS を解剖し、RNA-seq 解析を行い、*Gcn5* 発現量を調べた。(C-E) コントロール個体 (“KD-”) と、幼虫の各組織において *Gcn5* をノックダウンした個体 (“KD+”) について、成虫までの発生を調べた結果。*TIGS* は、幼虫の腸および脂肪体 (哺乳類では脂肪組織や肝臓に相当) 特異的な *GeneSwitch* であり、*UroGS* は

幼虫マルピーギ管（哺乳類では腎臓に相当）特異的な GeneSwitch である。各条件において、羽化率（胚数に対する雄雌の成虫の羽化数）の平均値をプロットした。**(F-H)** コントロール成虫（“KD-”）と、各ノックダウン履歴を持つ成虫（“KD+”）の寿命。**(I)** コントロール成虫（“-”）と、各ノックダウン履歴を持つ 1 週齢の成虫（“+”）の体重を、個体ごとに調べた結果。**(J)** コントロール成虫（“-”）と、各ノックダウン履歴を持つ 2 週齢の成虫（“+”）の運動能。

ns : not significant、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

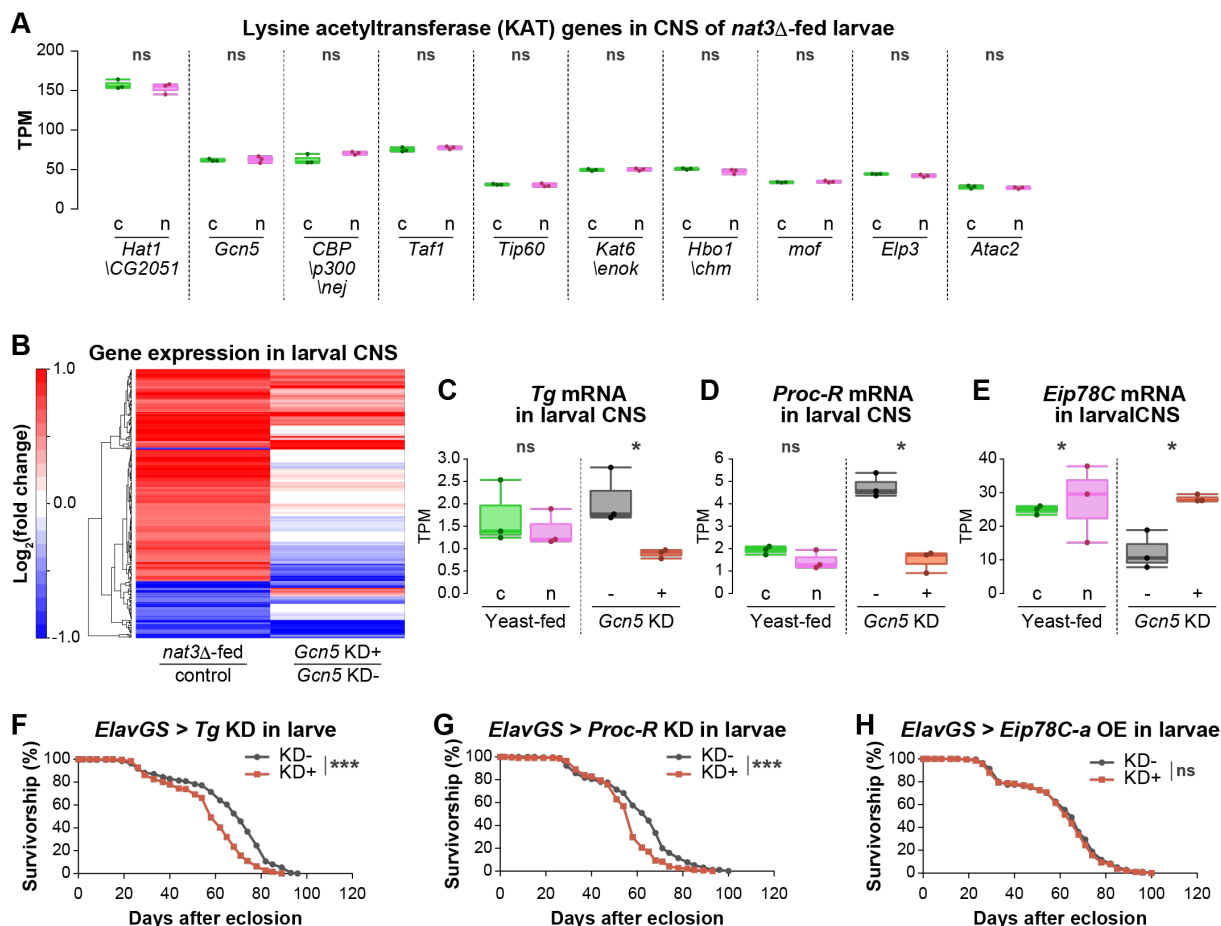


図 19. 幼虫 CNS の RNA-seq 解析結果と、Gcn5 下流の短命遺伝子の候補

幼虫の CNS を用いた RNA-seq 解析を行った。*nat3Δ* 餌摂取によって有意に発現変動した遺伝子は 82 (78 上昇、4 低下)、*Gcn5* ノックダウンによって有意に発現変動した遺伝子は 1,916 (967 上昇、949 低下) であった。(A) コントロール幼虫 (“c”) および *nat3Δ* 餌を食べた幼虫 (“n”) の CNS における、リジンアセチル化酵素群 (KATs; Feller et al., 2015) の遺伝子発現値 (RNA-seq 解析)。(B) 幼虫 CNS において、各条件間の遺伝子発現変動値を示したヒートマップ。左のカラムは、*nat3Δ* 餌を食べた個体とコントロールの間の変動値 ($\log_2$ (*nat3Δ*-fed/control))、右のカラムは、*Gcn5* ノックダウン個体とコントロール間の変動値 ($\log_2$ (*Gcn5* KD+/ *Gcn5* KD-)) である。ヒートマップ作成およびクラスタリング解析に用いた遺伝子は、 $\log_2$ (*nat3Δ*-fed/control) の絶対値が 0.5 を超える遺伝子である。(C-E) それぞれの幼虫 CNS における Transglutaminase (*Tg*)、Proctolin receptor (*Proc-R*)、Ecdysone-induced protein 78C (*Eip78C*) の発現量。左から、コントロール酵母餌条件 (“c”)、*nat3Δ* 餌摂取条件 (“n”)、*Gcn5* 非ノックダウン (コントロール) 条件 (“-”)、*Gcn5* ノックダウン条件 (“+”) の順に示した。これら 3 遺伝子は以下の数式を満たす: ($|\log_2$ (*nat3Δ*-fed/control)| > 0.5 $\cap$ $|\log_2$ (*Gcn5* KD+/ *Gcn5* KD-)| > 0.5)。(F-H) コントロール成虫 (“KD-”) と、各遺伝子を幼虫の神経系特異的にノックダウンあるいは過剰発現した成虫 (“KD+”) の寿命。

ns: not significant, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

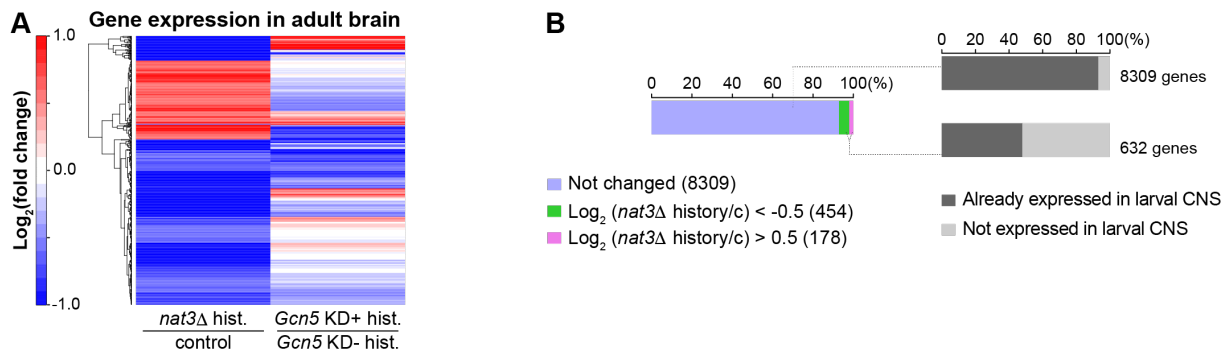


図 20. 成虫の脳の RNA-seq 解析

成虫の脳を用いた RNA-seq 解析を行った。*nat3Δ* 栄養履歴によって有意に発現変動した遺伝子は 113 (4 上昇、109 低下)、*Gcn5* ノックダウン履歴によって有意に発現変動した遺伝子は 54 (15 上昇、39 低下) であった。(A) 成虫の脳において、各条件間の遺伝子発現変動値を示したヒートマップ。左のカラムは、*nat3Δ* 栄養履歴を持つ個体とコントロール間の変動値 ($\log_2(\text{nat3}\Delta \text{ hist.}/\text{control})$)、右のカラムは、*Gcn5* ノックダウン履歴を持つ個体とコントロール間の変動値 ($\log_2(\text{Gcn5 KD+ hist.}/\text{Gcn5 KD- hist.})$) である。ヒートマップ作成およびクラスタリング解析に用いた遺伝子は、 $\log_2(\text{nat3}\Delta \text{ hist.}/\text{control})$ の絶対値が 0.5 を超える遺伝子である。(B) 成虫の脳と幼虫の CNS の RNA-seq 解析結果における、*nat3Δ* 餌の持つ長期的効果の考察。左図は、*nat3Δ* 栄養履歴を持つ成虫の脳において、発現変動の傾向があった遺伝子の数を示している。例えば、454 遺伝子 (緑) は、コントロールに対する発現変動値 $\log_2(\text{nat3}\Delta \text{ history}/\text{control})$ が -0.5 であり、*nat3Δ* 栄養履歴によって発現低下する傾向が見られた。一方、右の 2 図は、*nat3Δ* 栄養履歴によって影響を受けなかった遺伝子 (右上; 8,309 遺伝子)、あるいは影響を受けた遺伝子 (右下; 632 遺伝子) それぞれについて、幼虫の CNS で発現していた遺伝子と発現していなかった遺伝子の割合を示している。例えば、右上図を見ると、93 % (7,728 遺伝子) が幼虫の CNS ですでに発現しており、残りの 7.0% (581 遺伝子) については幼虫の CNS で発現しておらず、成虫の脳で発現が見られた遺伝子であることが分かる。

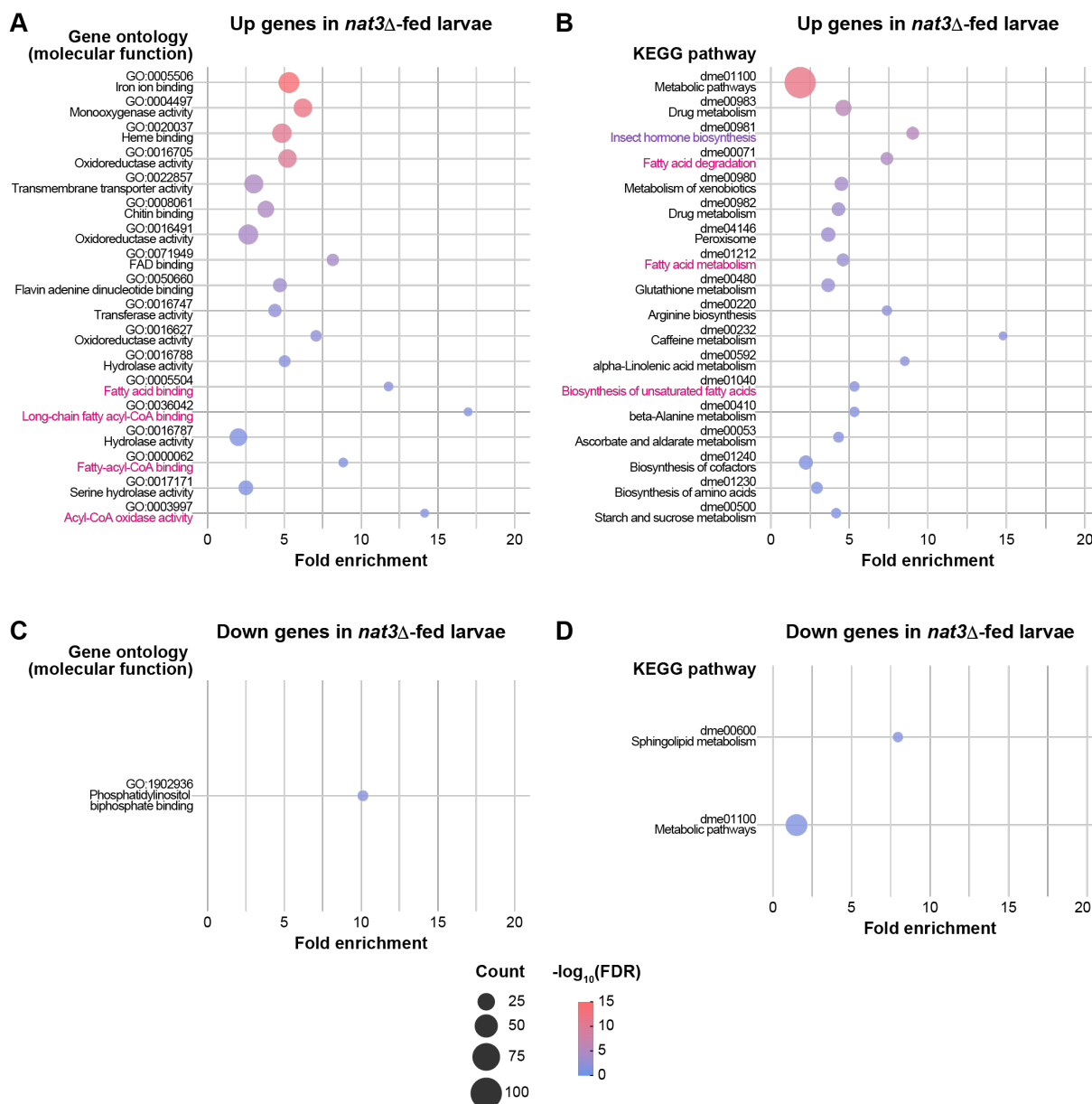


図 21. *nat3Δ* 餌を食べた幼虫において発現変動を示した遺伝子の機能解析

(A) 発現上昇した遺伝子の分子機能についての Gene Ontology (GO) 解析結果。各図の横軸は、それぞれの機能に該当する遺伝子の濃縮度合い (Fold enrichment) を表している。ドットの大きさは実際に該当した遺伝子数を、色は $-\log_{10}(FDR)$ 値を示している。解析は DAVID Functional Annotation Chart により行い、得られた FDR が 0.05 未満である GO term のみ記載した。(B) 発現上昇した遺伝子が濃縮する KEGG 経路の解析結果。(C) 発現低下した遺伝子の分子機能についての GO 解析結果。(D) 発現低下した遺伝子が濃縮する KEGG 経路の解析結果。

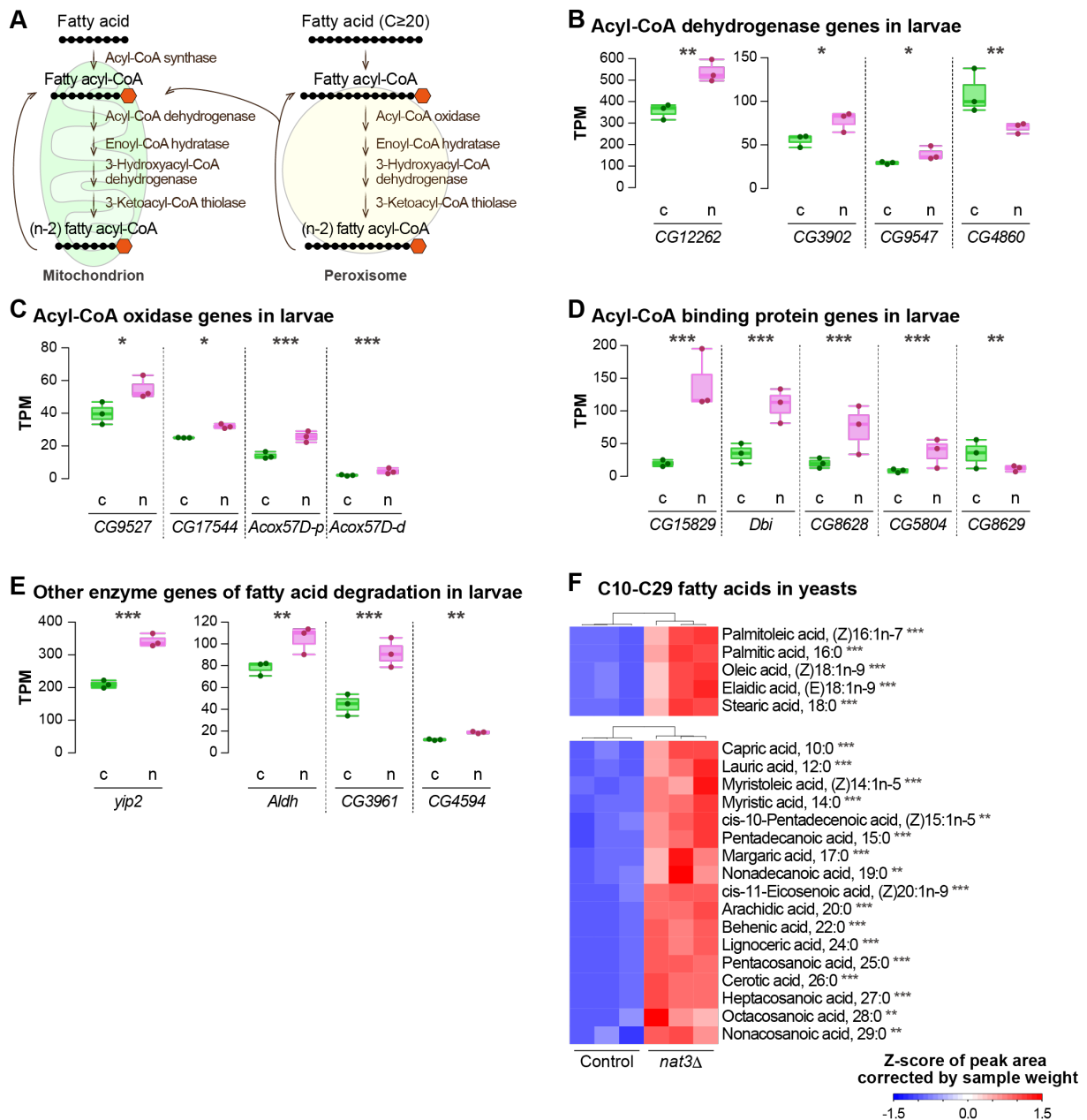


図 22. *nat3Δ* 餌では、炭素数 10 以上の脂肪酸が増加していた

(A) 飽和脂肪酸の β 酸化経路。飽和脂肪酸はその炭素鎖の長さにより、どの細胞小器官で代謝されるのかが異なる。極長鎖脂肪酸（炭素数 20 以上または 22 以上）は、まずペルオキシソームで β 酸化を受け、炭素数 6~10 程度になると、ミトコンドリアで代謝される。その他の脂肪酸は、初めからミトコンドリアで代謝される。この β 酸化の過程で、脂肪酸は 2 炭素ずつ鎖が短くなり、その都度アセチル CoA が生成される。(B-E) コントロール幼虫 (“c”) と *nat3Δ* 餌を食べた幼虫 (“n”) における、脂肪酸 β 酸化の酵素の遺伝子転写量 (RNA-seq 解析データ)。各カテゴリー分類については、GO 解析と FlyBase Genes Group の情報を参照した。なお、発現変動しなかった遺伝子と、発現が認められなかった遺伝子は各カテゴリーから省略している。発現変動しなかった遺伝子は CG7461 (B)、Arc42 (B)、CG5009 (C)、CG4586 (C)、CG8498 (D)、CG8814 (D) および CG14232 (D) であ

る。発現が認められなかった遺伝子は CG33713 (D) である。(F) コントロール酵母と *nat3Δ* 酵母に含まれる、炭素数 10 以上の脂肪酸の相対量。酵母中のほとんどの脂肪酸を占める、炭素数 16 と 18 の脂肪酸は GC-MS Split 法により分析し (上図)、その他は GC-MS Splitless 法により分析した (下図)。ヒートマップの 1 マスは、コントロール酵母あるいは *nat3Δ* 酵母の各レプリケートにおける、その脂肪酸量の Z スコアを示している。

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

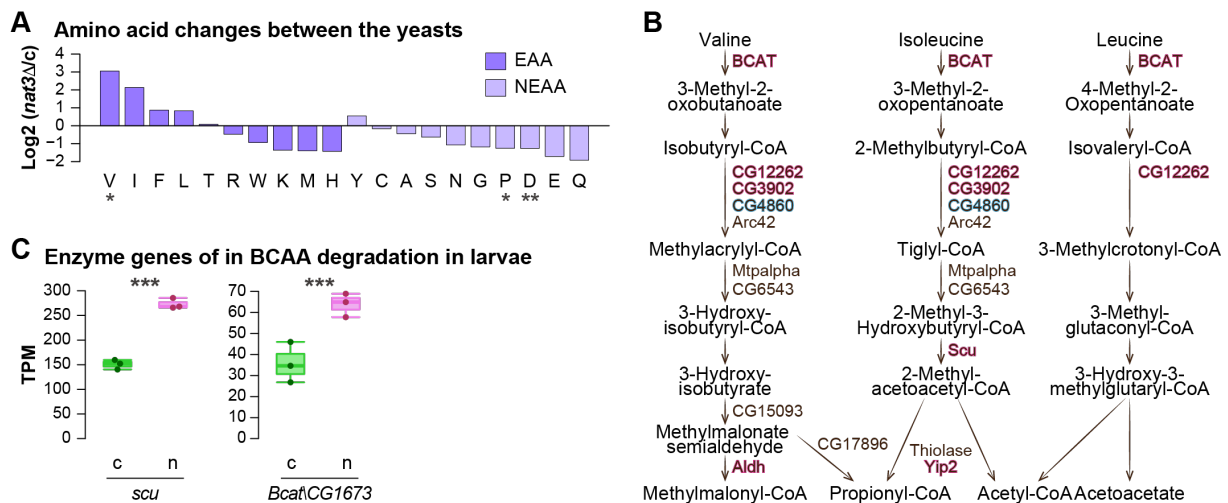


図 23. *nat3Δ* 餌では分岐鎖アミノ酸が増加していた

(A) コントロール酵母に対する、*nat3Δ* 酵母中のアミノ酸の量比 ($\log_2(\text{nat3}\Delta/c)$)。酵母の LC-MS/MS メタボローム解析データをもとに図を作成した。V：バリン、I：イソロイシン、F フェニルアラニン、L：ロイシン、T：スレオニン、R：アルギニン、W：トリプトファン、K：リジン、M：メチオニン、H：ヒスチジン、Y：チロシン、C：システイン、A：アラニン、S：セリン、N：アスパラギン、G：グリシン、P：プロリン、D：アスパラギン酸、E：グルタミン酸、Q：グルタミン、EAA：必須アミノ酸、NEAA：非必須アミノ酸。

(B) キイロショウジョウバエにおける、分岐鎖アミノ酸の代謝経路。本論で登場する酵素名を各経路に付した。そのうち、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫において、遺伝子発現が上昇した酵素名をピンク、低下した酵素名を水色で示した。分岐鎖アミノ酸代謝と脂肪酸 β 酸化を触媒する酵素は一部共通している (図 22B～22E と 図 30)。(C) コントロール幼虫 (“c”) と *nat3Δ* 餌を食べた幼虫 (“n”) における、酵素遺伝子 *Scu* および *Bcat* の転写量 (RNA-seq 解析データ)。これらの酵素は分岐鎖アミノ酸代謝を触媒する。その他の酵素の遺伝子転写量については、図 22B～22E を参照。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

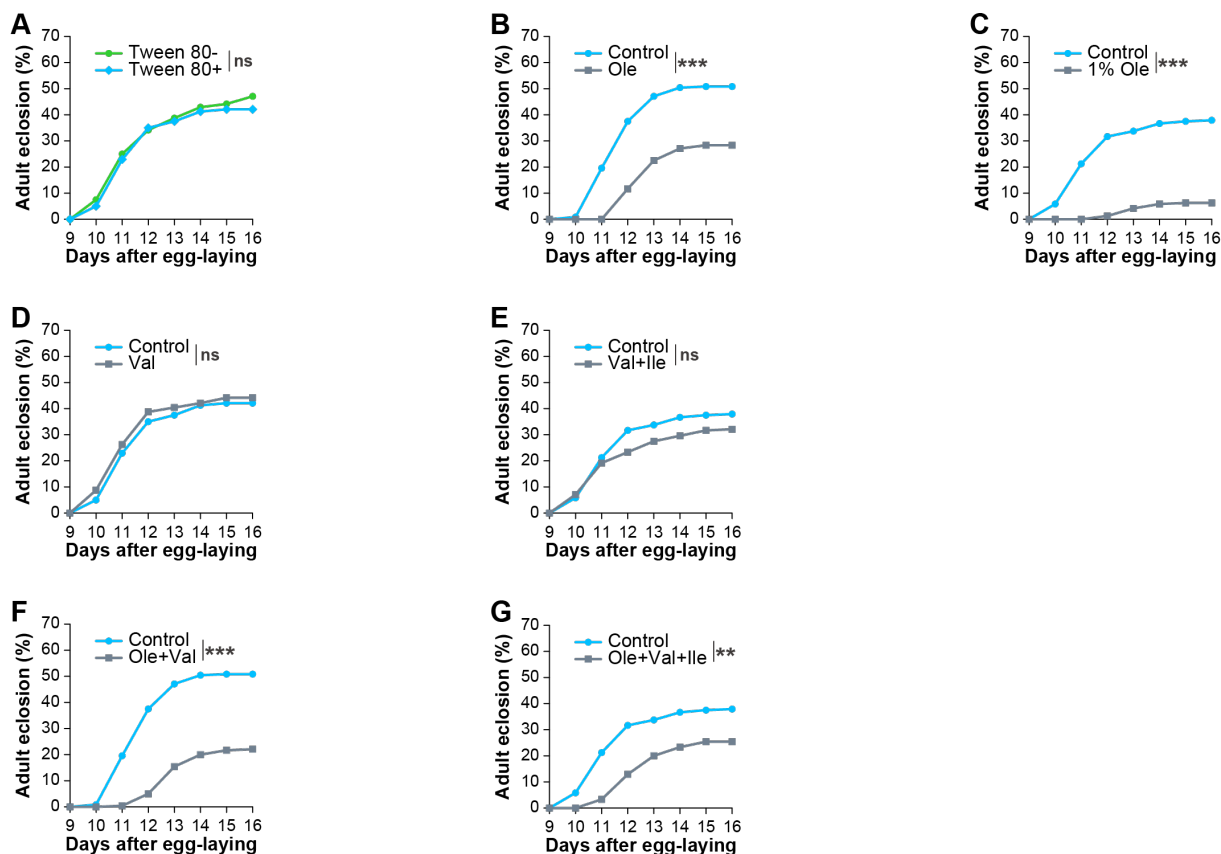


図 24. 長鎖脂肪酸または分岐鎖アミノ酸を増量させた餌を食べた、幼虫の発生

(A) 乳化剤 Tween 80 の有無が、幼虫から成虫までの発生に与える影響。コントロール酵母餌のみの場合 (“Tween 80-”) と、それに 0.05 % Tween 80 を添加した餌を幼虫に与えた場合 (“Tween 80+”) それぞれにおいて、羽化率（胚数に対する雄雌の成虫の羽化数）の平均値をプロットした。以下のパネル B-G では、0.05% Tween 80 含有餌をコントロールとしている。(B) 0.5 % オレイン酸（長鎖脂肪酸）を添加した餌を食べた幼虫の発生。(C) 1 % オレイン酸を添加した餌を食べた幼虫の発生。(D) 1.4 g/L バリン（分岐鎖アミノ酸）を添加した餌を食べた幼虫の発生。(E) 1.4 g/L バリンと 0.25 g/L イソロイシン（分岐鎖アミノ酸）を添加した餌を食べた、幼虫の発生。(F) 0.5 % オレイン酸と 1.4 g/L バリンを添加した餌を食べた、幼虫の発生。(G) 0.5 % オレイン酸、1.4 g/L バリンおよび 0.25 g/L イソロイシンを添加した餌を食べた、幼虫の発生。

ns : not significant, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。

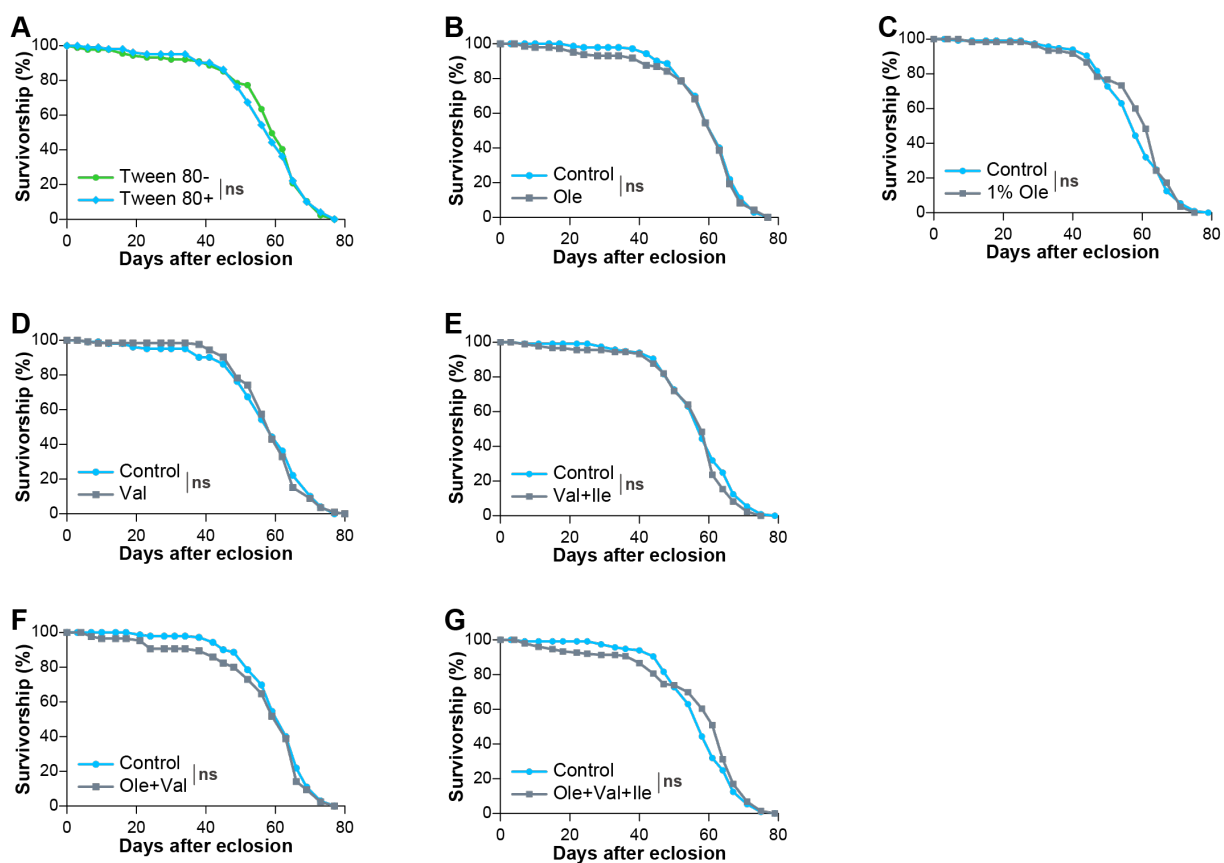


図 25. 長鎖脂肪酸または分岐鎖アミノ酸が豊富な栄養履歴を持つ、成虫の寿命

脂肪酸や分岐鎖アミノ酸が豊富な栄養履歴が、寿命にどのような影響を与えるかを調べた結果。図 24 の各パネルで得られた成虫を解析に用いた。

ns：not significant。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。

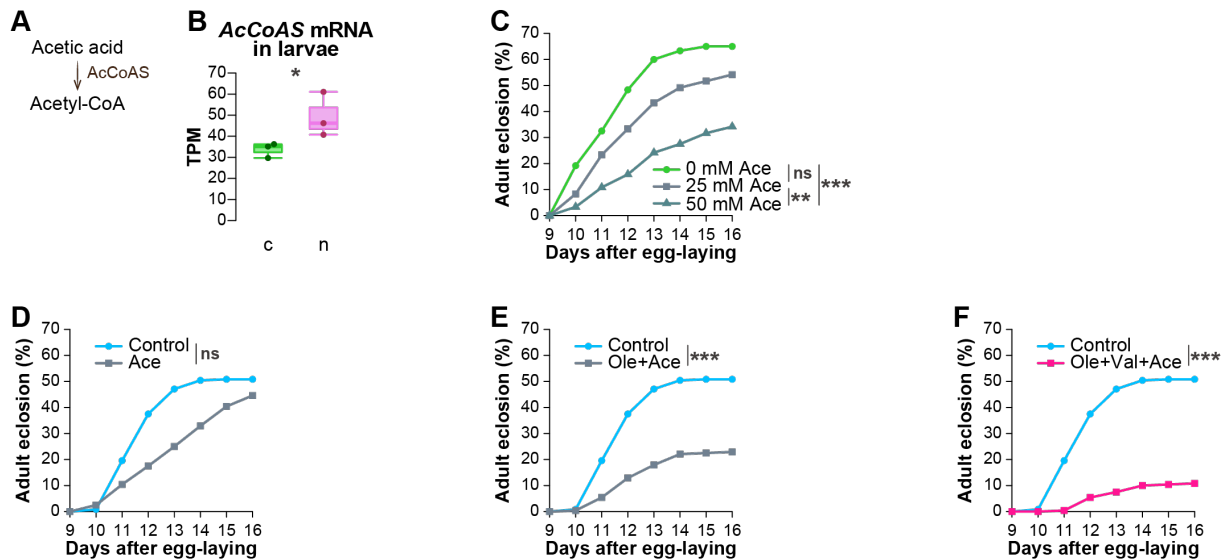


図 26. 長鎖脂肪酸、分岐鎖アミノ酸、および短鎖脂肪酸を増量させた餌を食べた、幼虫の発生

(A) 酢酸を消費して acetyl-CoA を生成する経路。キイロショウジョウバエにおいては、酵素 Acetyl-CoA Synthase (AcCoAS) がこの反応を触媒する。(B) コントロール幼虫 (“c”) と *nat3Δ* 餌を食べた幼虫 (“n”) における、*AcCoAS* 転写量 (RNA-seq 解析データ)。(C) Tween 80 を含んでいないコントロール酵母餌、これに 25 mM 酢酸緩衝液 (短鎖脂肪酸) を添加した餌、50 mM 酢酸緩衝液 (短鎖脂肪酸) を添加した餌のいずれかを食べた幼虫の発生。各条件において、羽化率 (胚数に対する雄雌の成虫の羽化数) の平均値をプロットした。(D) 0.05% Tween 80 を含んだコントロール酵母餌、これに 25 mM 酢酸緩衝液を添加した餌のどちらかを食べた幼虫の発生。以下のパネル E と F においても、0.05 % Tween 含有餌をコントロールとしている。(E) 0.5 % オレイン酸 (長鎖脂肪酸) と 25 mM 酢酸緩衝液を添加した餌を食べた、幼虫の発生。(F) 0.5 % オレイン酸、1.4 g/L バリン (分岐鎖アミノ酸) および 25 mM 酢酸緩衝液を添加した餌を食べた、幼虫の発生。

ns : not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

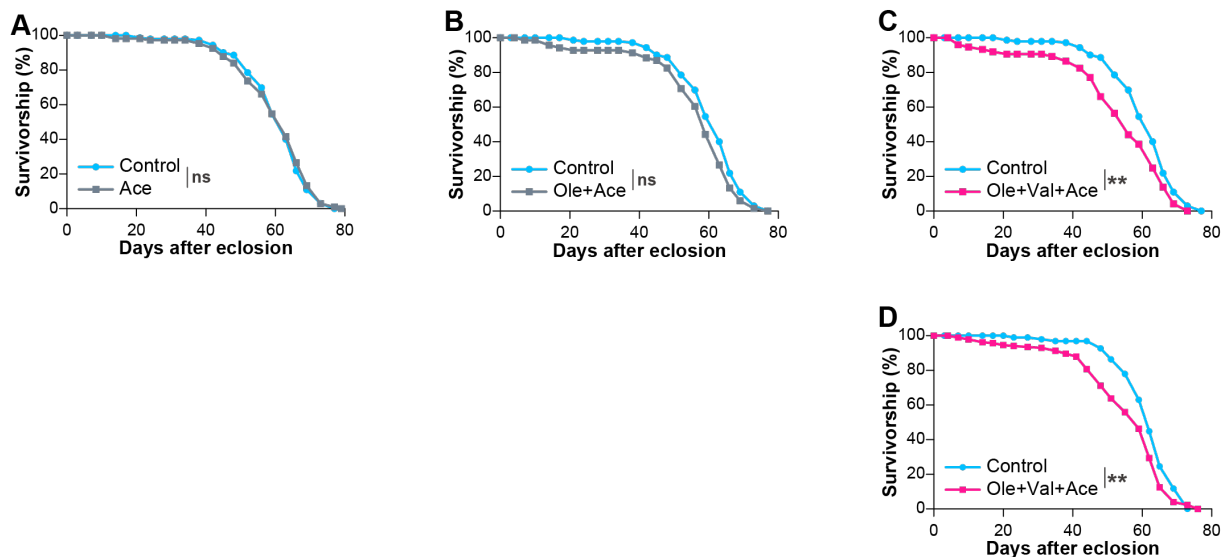


図 27. 長鎖脂肪酸、分岐鎖アミノ酸、および短鎖脂肪酸が豊富な栄養履歴では、成虫の寿命が短縮する

(A) コントロール成虫と、酢酸豊富な栄養履歴を持つ成虫の寿命。酢酸緩衝液は、0.05% Tween 80 を含んだコントロール酵母餌に、25 mM の濃度で添加した（以下のパネル B-D でも共通）。(B) 0.5 % オレイン酸（長鎖脂肪酸）と 25 mM 酢酸緩衝液を増量した栄養履歴を持つ、成虫の寿命。(C と D) 0.5 % オレイン酸、1.4 g/L バリン（分岐鎖アミノ酸）および 25 mM 酢酸緩衝液を増量した栄養履歴を持つ、成虫の寿命。パネル C と D は独立の試行である。

ns : not significant、** $P < 0.01$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。

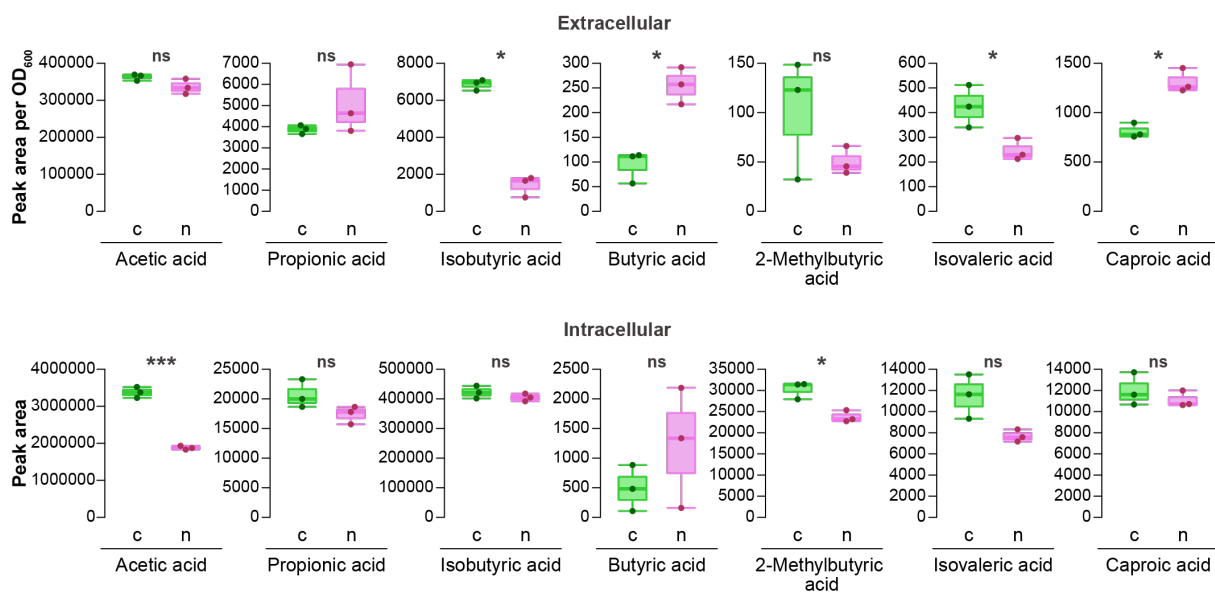


図 28. *nat3Δ* 酵母における細胞外・細胞内の短鎖脂肪酸量

コントロール酵母 (“c”) と *nat3Δ* 酵母 (“n”) における、炭素数 2-6 の脂肪酸の相対量。上段は細胞外の脂肪酸量を示しており、y 軸は LC-MS 分析で得られた面積値を、酵母懸濁液における吸光度 OD₆₀₀ で補正した値である。下段は細胞内の脂肪酸量を示しており、y 軸は LC-MS 分析で得られた面積値である。

ns : not significant、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。



図 29. OVA 餌を食べた幼虫と *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の遺伝子発現変動の高類似性

(A) オレイン酸、バリン、および酢酸を増量した餌（OVA 餌）を食べた幼虫において、発現上昇した遺伝子と、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫において発現上昇した遺伝子のベン図。(B) OVA 餌を食べた幼虫において発現低下した遺伝子と、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫において発現低下した遺伝子のベン図。

*** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。

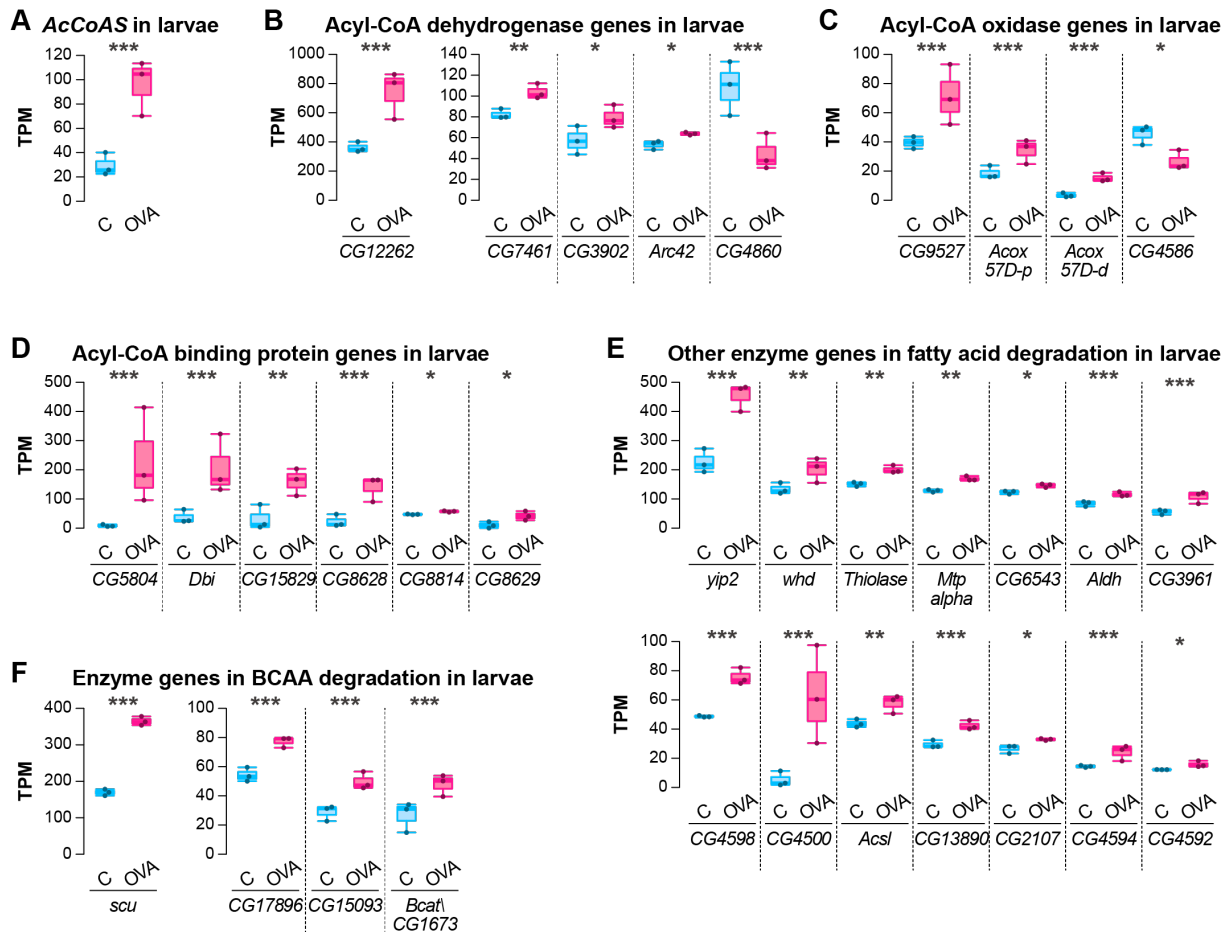


図 30. OVA 餌を食べた幼虫では、オレイン酸、バリン、酢酸の各代謝経路の酵素の遺伝子発現が上昇していた

(A) コントロール幼虫 (“C”) と OVA 餌を食べた幼虫 (“OVA”) における、*AcCoAS* 転写量 (RNA-seq 解析データ)。(B-E) コントロール幼虫 (“C”) と OVA 餌を食べた幼虫 (“OVA”) における、脂肪酸 β 酸化の酵素の遺伝子転写量 (RNA-seq 解析データ)。各カテゴリー分類については、GO 解析と FlyBase Genes Group の情報を参照した。なお、発現変動しなかった遺伝子と、発現が認められなかった遺伝子は各カテゴリーから省略している。発現変動しなかった遺伝子は *CG7461* (B)、*CG9547* (B)、*CG5009* (C)、*CG17544* (C)、*CG8498* (D) および *CG14232* (D) である。発現が認められなかった遺伝子は *CG33713* (D) である。(F) コントロール幼虫 (“C”) と OVA 餌を食べた幼虫 (“OVA”) における、酵素遺伝子 *Scu*、*CG17896*、*CG15093* および *Bcat* の転写量 (RNA-seq 解析データ)。これらの酵素は分岐鎖アミノ酸代謝を触媒する。その他の酵素の遺伝子転写量については、パネル B~E および図 23B を参照。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

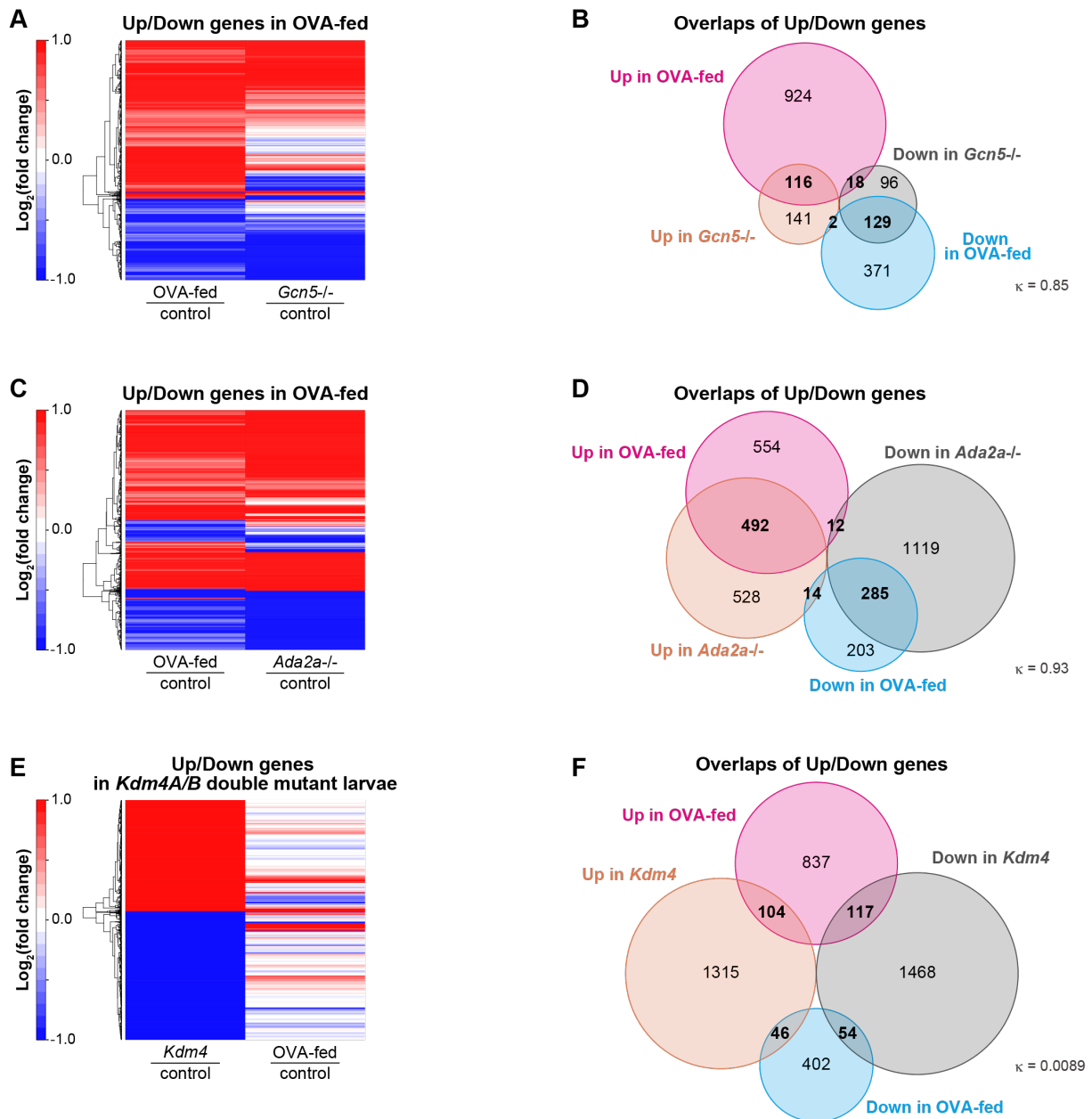


図 31. OVA 餌を食べた幼虫の遺伝子発現変動と、ヒストンアセチル基転移酵素変異体の遺伝子発現変動は似ている

(A と B) OVA 餌を食べた幼虫の RNA-seq データと、*Gcn5* 変異体幼虫のマイクロアレイデータ (Carré et al., 2008) の比較。(A) 遺伝子発現変動値 (左: $\log_2$ (OVA-fed/control)、右: $\log_2$ (*Gcn5*^{-/-}/control)) を示したヒートマップ。OVA 餌摂食により有意に発現変動した遺伝子に絞り、クラスタリング解析を行った。(B) 各条件について、コントロールよりも有意に発現が上昇 (“Up”) または低下 (“Down”) した遺伝子のベン図。重複していた遺伝子数は太字にしており、それら 4 つの数字を用いて、相関度の指標であるカッパ係数 (κ) を算出した。(C と D) OVA 餌を食べた幼虫の RNA-seq データと *Ada2a* 変異体幼虫のマイクロアレイデータ (Carré et al., 2008) の比較。(E と F) OVA 餌を食べた幼虫の RNA-seq データと *Kdm4A/Kdm4B* (“*Kdm4*”) 変異体幼虫のマイクロアレイデータ (Tsurumi et al., 2019) の比較。

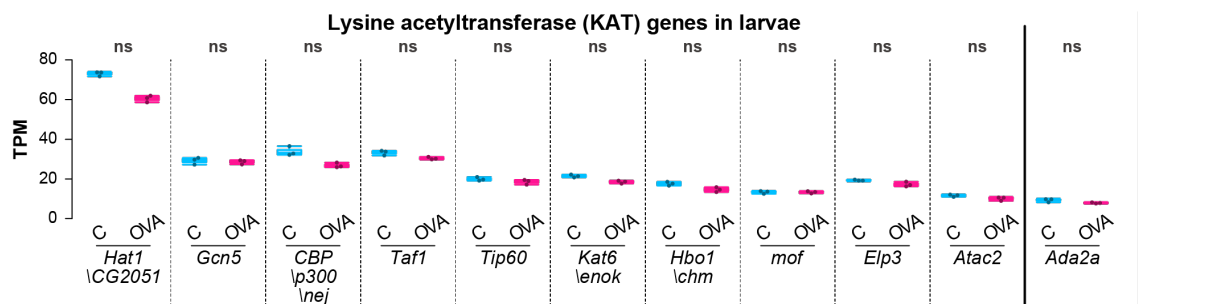


図 32. リジンアセチル化酵素群(KATs)の発現は OVA 餌による影響を受けない

コントロール幼虫 (“C”)、および OVA 餌を食べた幼虫 (“OVA”) における *Gcn5* を含むリジンアセチル化酵素群 (KATs ; Feller et al., 2015) と *Ada2a* の遺伝子発現値 (RNA-seq 解析データ)。

ns : not significant. テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

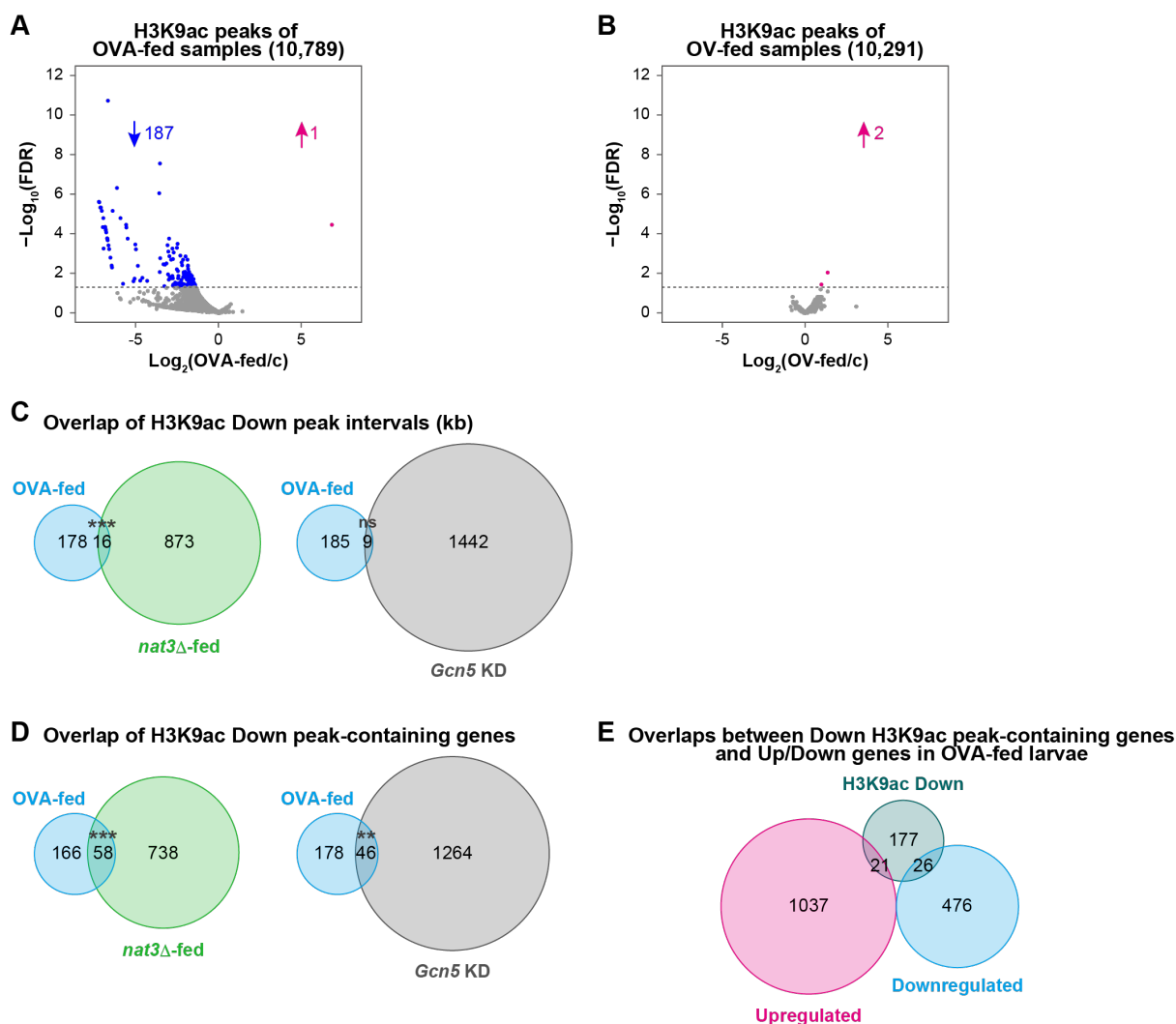


図 33. OVA 餌を食べた幼虫においてもヒストンアセチル化が低下していた

(A と B) H3K9ac ピークの volcano プロット。OVA 餌摂食 (A) あるいは OV 餌摂食 (B) により、コントロールと比べて有意に ($P < 0.05$; 詳細は 4.11.2. を参照) H3K9ac レベルが上昇または減少したピークを、マゼンタ色または青色のデータポインターで示した。変動しなかったピークは灰色で示した。(C) H3K9ac 低下ピークの裾野長の合計値 (kb) のベン図。左図は、OVA 餌摂食による H3K9ac 低下ピークと、*nat3Δ* 餌摂食による H3K9ac 低下ピークの比較であり、両者は有意に重なっていた。右図は、OVA 餌摂食による H3K9ac 低下ピークと、*Gcn5* ノックダウンによる H3K9ac 低下ピークの比較である。(D) H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子数のベン図。左図は、OVA 餌摂食による H3K9ac 低下ピークと、*nat3Δ* 餌摂食による H3K9ac 低下ピークの比較であり、これらのピークを含む遺伝子は有意に共通していた。右図は OVA 餌摂食による H3K9ac 低下ピークと、*Gcn5* ノックダウンによる H3K9ac 低下ピークの比較であり、これらのピークを含む遺伝子は有意に共通していた。(E) OVA 餌摂食による H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子と、発現変動遺伝子のベン図。H3K9ac 低下ピークを含む遺伝子と発現変動遺伝子の重複は大きくなかった。

ns : not significant, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。

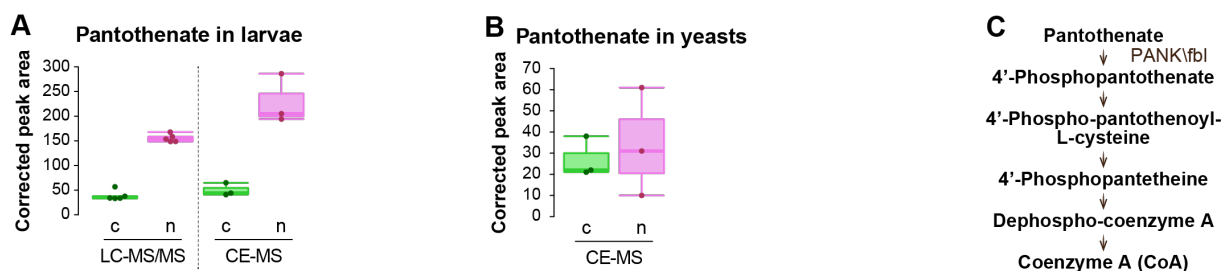


図 34. *nat3Δ* 餌を食べた幼虫体内ではパントテン酸が増加していた

(A) コントロール幼虫 (“c”) と *nat3Δ* 餌を食べた幼虫 (“n”) におけるパントテン酸量。それぞれ、幼虫のメタボローム解析データ (LC-MS/MS と CE-MS) をもとにプロットした。(B) コントロール酵母 (“c”) と *nat3Δ* 酵母 (“n”) におけるパントテン酸量。酵母のメタボローム解析データ (CE-MS) をもとにプロットした。(C) キイロショウジョウバエにおける、パントテン酸から CoA が生成されるまでの経路。Pantothenate kinase (PANK) がこの経路の律速酵素である。

P 値やテスト名、サンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

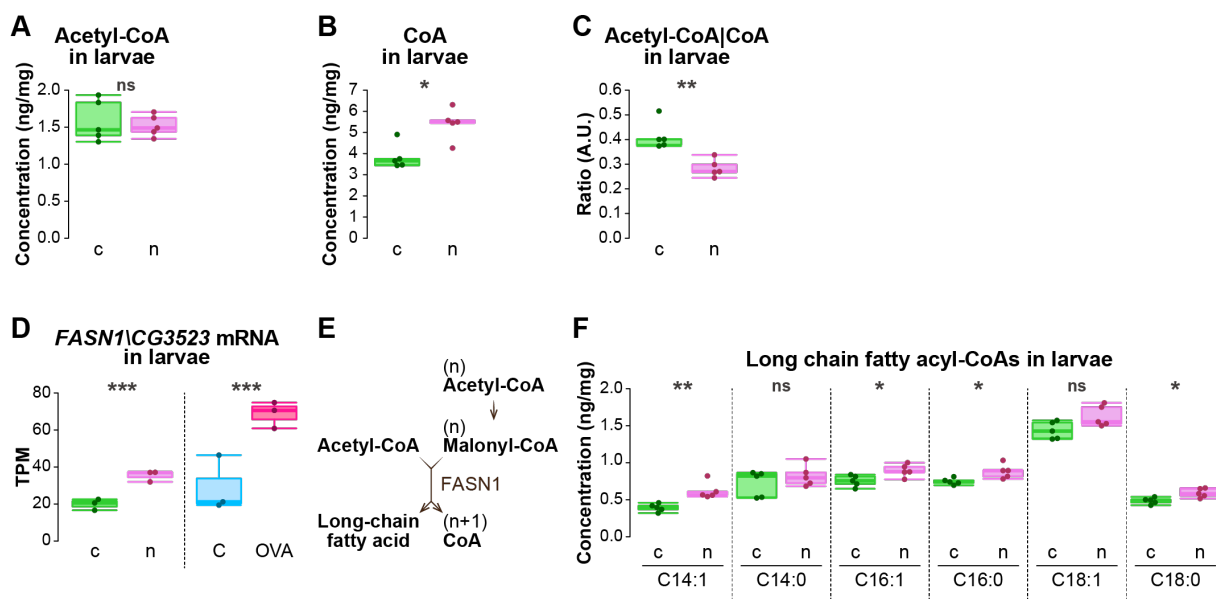


図 35. *nat3Δ* 餌を食べた幼虫では、Gcn5 機能を抑制するような代謝産物が増えていた

(A-C) コントロール幼虫 (“c”) と *nat3Δ* 餌を食べた幼虫 (“n”) における、アセチル CoA 量 (A)、CoA 量 (B) および CoA に対するアセチル CoA の相対比 (C)。パネル A と B では、幼虫の体重 1 mg あたりのアセチル CoA 量または CoA 量 (ng/mg) を示している。(D) 幼虫における *FASN1* 転写量 (RNA-seq 解析データ)。左から、コントロール酵母を食べた幼虫 (“c”)、*nat3Δ* 餌を食べた幼虫 (“n”)、0.05% Tween 80 含有コントロール酵母餌を食べた幼虫 (“C”)、OVA 餌を食べた幼虫 (“OVA”) の順に表示した。(E) 脂肪酸合成経路。酵素 FASN1 により、アセチル CoA とマロニル CoA (アセチル CoA から生成される) が消費されて、CoA が副産物として生成される。(F) コントロール幼虫 (“c”) と *nat3Δ* 餌を食べた幼虫 (“n”) の体重 1 mg あたりの、長鎖脂肪酸アシル CoA 量 (ng/mg)。

ns : not significant、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。箱ひげ図については 4.14. で説明。

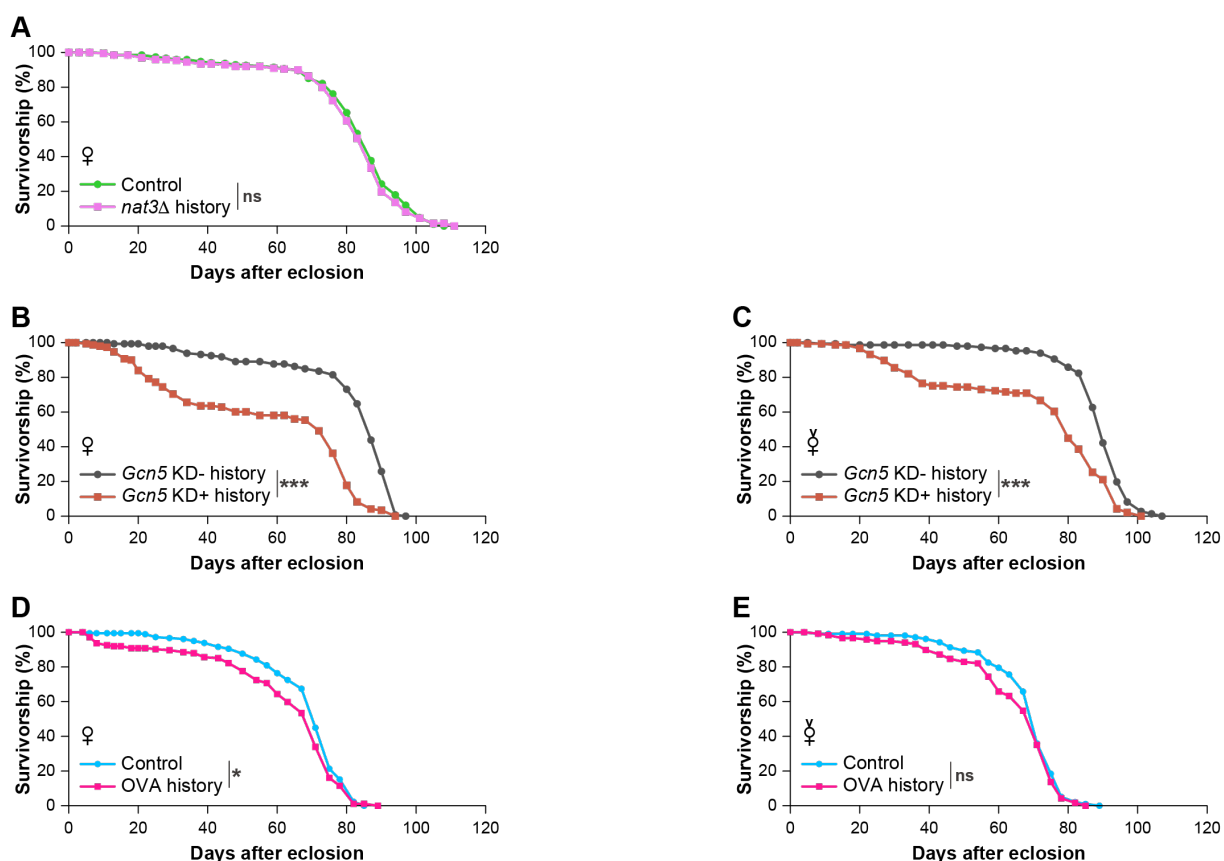


図 36. メスでは、栄養履歴や *Gcn5* ノックダウン履歴の影響が比較的小さかった

(A) コントロールのメスの成虫と、*nat3Δ* 栄養履歴を持つメスの成虫の寿命。交尾済みのメスのみ用いた。(B と C) コントロールのメスの成虫と、*Gcn5* ノックダウン履歴を持つメスの成虫の寿命。パネル B では交尾済みのメスを、パネル C では未交尾のメスを用いた。(D と E) コントロールのメスの成虫と、OVA 栄養履歴を持つメスの成虫の寿命。パネル D では交尾済みのメスを、パネル E では未交尾のメスを用いた。

ns : not significant、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。

A Up/Down genes between *DaGS* > *Gcn5* KD ♂♀



B Up/Down genes between OVA-fed ♂♀



図 37. 遺伝子発現の性差

(A) *Gcn5* をノックダウンしたオスの幼虫で発現変動した遺伝子と、*Gcn5* をノックダウンしたメスの幼虫で発現変動した遺伝子のベン図。左は発現上昇した遺伝子の比較、右は発現低下した遺伝子の比較である。(B) OVA 餌を食べたオスの幼虫で発現変動した遺伝子と、OVA 餌を食べたメスの幼虫で発現変動した遺伝子のベン図。左は発現上昇した遺伝子の比較、右は発現低下した遺伝子の比較である。

*** $P < 0.001$ 。テスト名やサンプルサイズなどの情報は表 12 を参照。

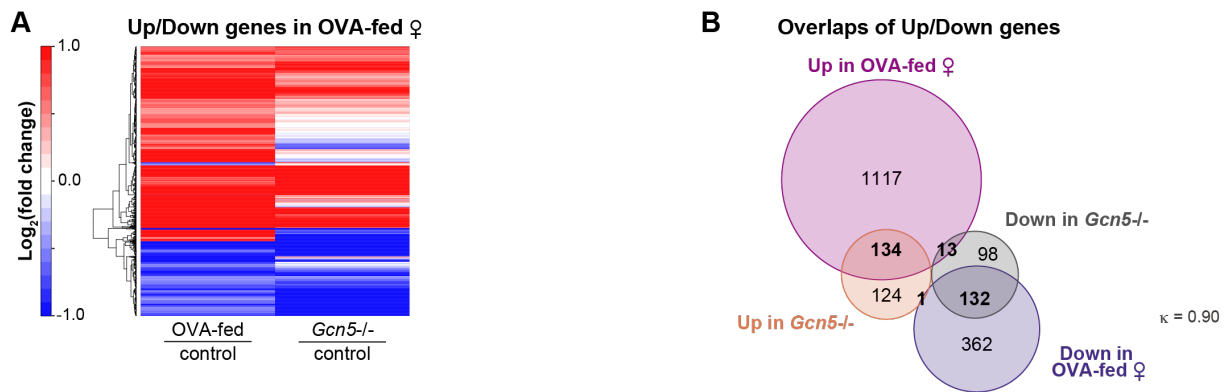


図 38. OVA 餌を食べたメスの幼虫の遺伝子発現変動と、ヒストンアセチル基転移酵素変異体の遺伝子発現変動は似ている

(A) OVA 餌を食べたメスの幼虫の RNA-seq データと、*Gcn5* 変異体幼虫のマイクロアレイデータ (Carré et al., 2008) の比較。(A) 遺伝子発現変動値 (左: $\log_2$ (OVA-fed/control)、右: $\log_2$ (*Gcn5*^{-/-}/control)) を示したヒートマップ。OVA 餌摂食により有意に発現変動した遺伝子に絞り、クラスタリング解析を行った。(B) 各条件について、コントロールよりも有意に発現が上昇 (“Up”) または低下 (“Down”) した遺伝子のベン図。重複していた遺伝子数は太字にしており、それら 4 つの数字を用いて、相関度の指標であるカッパ係数 (κ) を算出した。

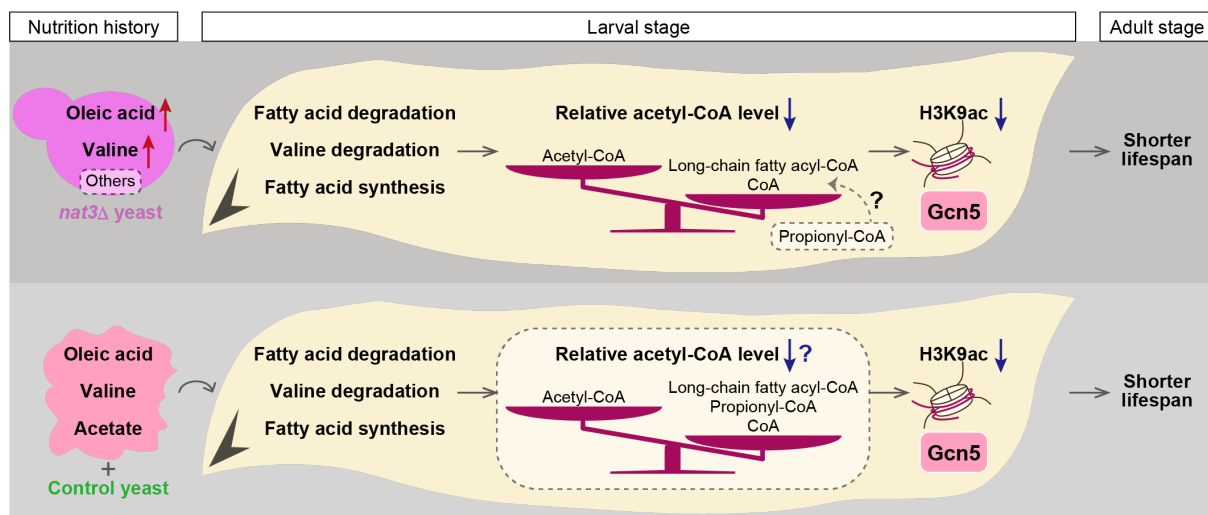


図 39. 本研究のまとめ図: *nat3Δ* 栄養履歴および OVA 栄養履歴がもたらすエピジェネティクス変化

(上段) *nat3Δ* 餌を食べた幼虫内の応答。*nat3Δ* 餌は、オレイン酸（長鎖脂肪酸）やバリン（分岐鎖アミノ酸）が豊富な餌であり、これらが寿命短縮に寄与すると考えられる。加えて、第三の栄養素も寄与すると考えられる (3.2.)。この *nat3Δ* 餌を食べた幼虫の体内では、脂肪酸 β 酸化、バリン（分岐鎖アミノ酸）代謝、脂肪酸合成それぞれの酵素遺伝子の発現が上昇する。これらの代謝が同時に亢進することにより、アセチル CoA とその他の CoA 関連代謝産物の比率が変化する。実際にプロピオニル CoA の量は測定していないが、バリンの代謝産物であるプロピオニル CoA も増加していると推測される。長鎖脂肪酸アシル CoA や、CoA、プロピオニル CoA が増加し、これらに対するアセチル CoA の相対量が減少することにより、Gcn5 のアセチル化機能が低下する。この幼虫内のエピジェネティック変化が、将来の寿命短縮に繋がると考えられる。(下段) OVA 餌を食べた幼虫内の応答。オレイン酸、バリンおよび酢酸（短鎖脂肪酸）が豊富な餌を食べた幼虫の体内では、脂肪酸 β 酸化、バリン（分岐鎖アミノ酸）代謝、脂肪酸合成が同時に亢進する。その結果、長鎖脂肪酸アシル CoA や、CoA、プロピオニル CoA に対するアセチル CoA の相対量が減少し、これが Gcn5 のアセチル化機能が低下させると考えられる。つまり、*nat3Δ* 餌を食べた場合と OVA 餌を食べた場合において、同様の応答変化が起き、エピジェネティック変化に繋がるとはならないかと考えている。

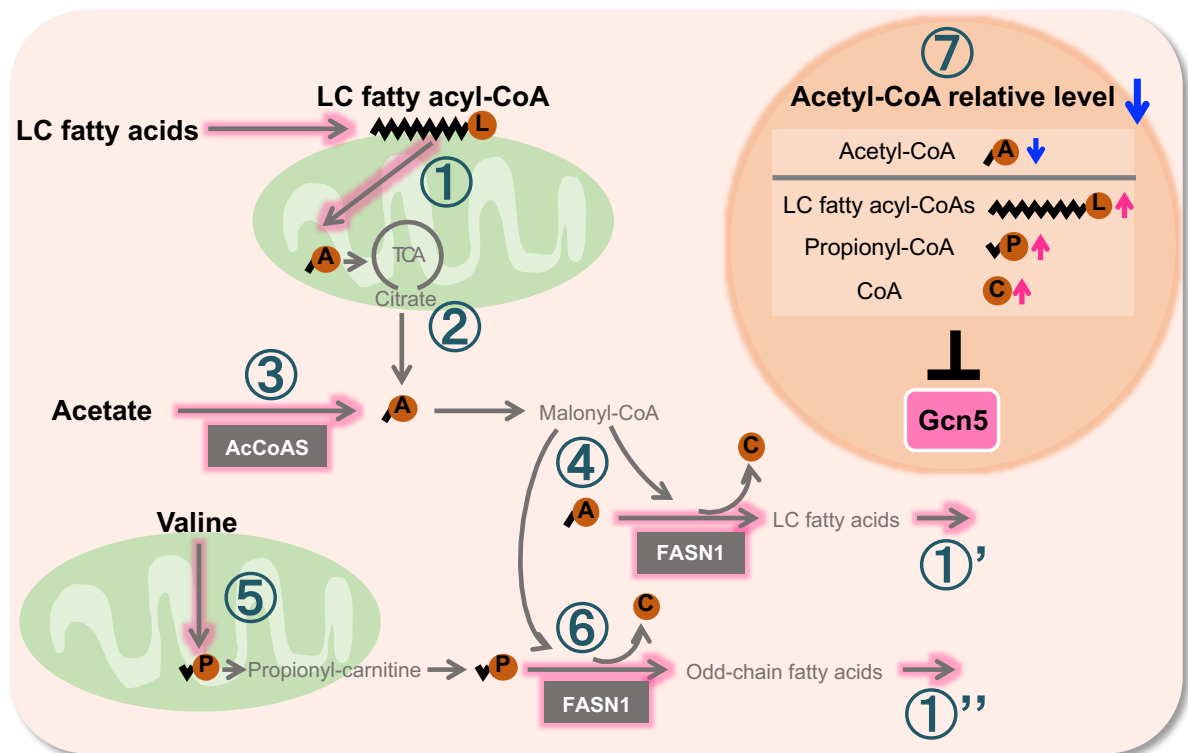


図 40. 幼虫細胞における、アセチル CoA の相対量低下に至る応答

長鎖脂肪酸、酢酸、バリンが幼虫の細胞内に取り込まれてから、アセチル CoA の相対量低が低下するまでの応答を考察する。①長鎖脂肪酸は長鎖脂肪酸アシル CoA に変換され、ミトコンドリアで β 酸化を受ける。その過程でアセチル CoA が生成される。②アセチル CoA はそのままの形ではミトコンドリア外に出ることはできず、TCA 回路によりクエン酸に変換されると、細胞質に出ることができる。③酢酸は、酵素 AcCoAS によりアセチル CoA に変換される。④このアセチル CoA と、アセチル CoA から生成されるマロニル CoA は、酵素 FASN1 による脂肪酸合成に利用され、この過程で長鎖脂肪酸と同時に CoA が生成される。図には示していないが、FASN1 は自身のアセチル化により活性化される。ここにおいて、アセチル CoA がさらに消費され、CoA が生成される。①'生み出された長鎖脂肪酸は、ミトコンドリアで β 酸化を受ける。⑤一方、バリンはミトコンドリアでプロピオニル CoA に代謝され、プロピオニルカルニチンへの変換を経て、細胞質に入る。⑥プロピオニル CoA とマロニル CoA は、FASN1 による奇数鎖脂肪酸の合成に使用され、CoA も生成される。①''奇数鎖脂肪酸はミトコンドリアで β 酸化を受ける。⑦以上により、細胞質内および核内の長鎖脂肪酸アシル CoA、プロピオニル CoA、CoA は増加し、これらに対するアセチル CoA の相対量が減少する。このエピジェネティック変化が幼虫の神経細胞で起き、成虫の寿命短縮につながると考えられる。

表

表 1. 栄養履歴として用いた 46 の酵母一遺伝子ノックアウト株

46 の酵母株におけるノックアウト遺伝子の機能と、各酵母株を食べた幼虫の発生と成虫の寿命の結果の一覧。根拠論文 (<https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44319-025-00503-8>) の Dataset EV1 を参照。

表 2. 寿命アッセイの結果

全寿命アッセイの解析結果。本研究では、同時に行った寿命アッセイを、別の図に分けて表示している場合がある（図 6E と図 8 の Round 8）。以下では、そのようなアッセイをまとめて記載している。

Sample size：各集団の全個体数。

Censor number：生死を最後まで追跡できなかった（打ち切り）個体数。例えば、図 6C “Live yeast history” 条件では、はじめ 90 個体いたものの、途中で 4 個体を逃したため、それらを打ち切りとして解析した。

Median lifespan：集団の半数が死ぬまでかかった日数（中間寿命）。

Raw *P* value：Log-rank test による *P* 値。特筆しない限り、コントロールとの比較における検定結果を示している。

Adjusted *P* value：Bonferroni 法による補正後の *P* 値。多重比較の場合のみ記載。

Fig.	Condition	Sample size	Censor number	Median lifespan [days]	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
6C	Live yeast history	90	4	67.92	.	.
	LSF history	190	1	67.16	0.0229	.
6E 8-R8	Live yeast history 2x	109	0	68.89	0.3056	0.9169
	Control (live yeast history 1x)	90	0	67.33	.	.
	Live yeast history 1/2x	116	3	67.26	0.6823	1
	brp1 history	100	2	72.18	0.0013	0.0039
8- R1 9B	Control	110	5	65.61	.	.
	tup1 history	89	3	68.05	0.5180	1
	cka2 history	118	9	64.09	0.7018	1
	swa2 history	98	2	62.01	0.1732	1
	mid2 history	117	3	65.01	0.7641	1
	pkp2 history	109	3	62.83	0.3147	1
	nat3 history	110	9	60.05	0.0012	0.0071
8- R2	Control	80	3	66.69	.	.
	rnr4 history	140	6	63.87	0.4789	1
	syf2 history	110	1	63.90	0.693	1
	fes1 history	139	6	65.09	0.3511	1
	vma22 history	70	2	63.02	0.0254	0.1018

Fig.	Condition	Sample size	Censor number	Median lifespan [days]	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
8- R3	Control	90	5	61.39	.	.
	hrd3 history	110	5	59.66	0.3006	1
	shp1 history	110	2	59.86	0.4390	1
	ino2 history	70	2	61.04	0.7130	1
	tvpl38 history	120	5	59.81	0.6585	1
	mrx14 history	140	2	59.18	0.1520	0.912
	vma9 history	48	3	59.58	0.3919	1
8- R4	Control	80	1	60.22	.	.
	rgi2 history	70	3	59.17	0.2925	1
	nrt1 history	110	4	59.02	0.0838	0.3352
	fur4 history	80	1	59.33	0.241	0.9642
	tps1 history	150	6	58.55	0.4985	1
8- R5	Control	36	3	64.85	.	.
	crs5 history	65	2	66.40	0.4163	1
	dpp1 history	129	6	69.01	0.2400	0.7199
	ygl007c-a history	80	2	66.22	0.3330	0.9989
8- R6	Control	110	1	70.55	.	.
	irc6 history	107	0	70.38	0.9308	1
	ids2 history	120	3	68.90	0.0347	0.1388
	vma9 history	40	1	72.00	0.6042	1
	brp1 history	39	2	76.47	0.0055	0.0221
8- R7	Control	77	1	70.01	.	.
	crs5 history	60	0	68.00	0.1480	0.592
	aan1 history	105	3	68.87	0.2147	0.8588
	nrp1 history	110	1	70.53	0.6786	1
	vma11 history	27	2	69.02	0.3288	1
9C	Control	140	2	68.86	.	.
	nat3 history	143	1	57.95	3.5E-08	.
17F	DaGS > mCherry KD-	200	11	53.45	.	.
	DaGS > mCherry KD+	200	7	52.07	0.3303	.

Fig.	Condition	Sample size	Censor number	Median lifespan [days]	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
17G	DaGS > Gcn5 KD-	200	14	61.79	.	.
	DaGS > Gcn5 KD+	200	9	42.12	< 1.0E-10	.
17K	DaGS > Gcn5 KD- (0 μ M)	200	0	50.73	.	.
	DaGS > Gcn5 KD+ (5 μ M)	200	0	21.40	< 1.0E-10	< 1.0E-10
	DaGS > Gcn5 KD+ (10 μ M)	200	0	21.49	< 1.0E-10	< 1.0E-10
	DaGS > Gcn5 KD+ (20 μ M)	200	0	18.75	< 1.0E-10	< 1.0E-10
	5 μ M vs. 10 μ M				0.7176	1
	5 μ M vs. 20 μ M				0.0002	0.0006
	10 μ M vs. 20 μ M				0.0011	0.0032
18F	ElavGS > Gcn5 KD-	200	11	66.95	.	.
	ElavGS > Gcn5 KD+	200	2	41.06	< 1.0E-10	.
18G	TIGS > Gcn5 KD-	200	11	55.80	.	.
	TIGS > Gcn5 KD+	200	13	54.11	0.1724	.
18H	UroGS > Gcn5 KD-	200	12	62.31	.	.
	UroGS > Gcn5 KD+	200	2	59.81	0.4282	.
19F	ElavGS > Tg KD-	200	10	69.10	.	.
	ElavGS > Tg KD+	200	7	57.78	< 1.0E-10	.
19G	ElavGS > Proc-R KD-	200	5	62.37	.	.
	ElavGS > Proc-R KD+	200	2	55.00	9.9E-08	.
19H	ElavGS > Eip78C-a OE-	193	11	64.46	.	.
	ElavGS > Eip78C-a OE+	200	5	62.46	0.3665	.
25A 25D	Control (live yeast history + tween 80)	104	4	57.28	.	.
	Valine history	124	6	57.53	0.6877	1
	Live yeast history	90	3	58.92	0.9936	1
25B	Control (live yeast history + tween 80)	143	5	60.24	.	.
25F	Oleic acid history	145	0	60.13	0.6989	1
27A	Oleic acid + valine history	85	0	59.55	0.3685	1
27B	Acetic acid history	107	1	60.43	0.7440	1
27C	Oleic acid + acetic acid history	69	1	57.92	0.0465	0.2323

Fig.	Condition	Sample size	Censor number	Median lifespan [days]	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	Oleic acid + valine + acetic acid history	74	1	54.07	0.0011	0.0053
25C	Control (live yeast history + tween 80)	117	4	56.79	.	.
25E	1% Oleic acid history	60	1	60.57	0.3693	1
25G	Valine + isoleucine history	89	1	57.57	0.3353	1
	Oleic acid + valine + isoleucine history	150	2	61.13	0.1247	0.3741
27D	Control (live yeast history + tween 80)	98	4	61.15	.	.
	Oleic acid + valine + acetic acid history	186	8	57.45	0.0011	.
36A	Control ♀	270	2	83.86	.	.
	nat3 history ♀	199	1	83.12	0.3527	.
36B	DaGS > Gcn5 KD- ♀	150	6	85.82	.	.
	DaGS > Gcn5 KD+ ♀	150	3	71.48	< 1.0E-10	.
36C	DaGS > Gcn5 KD- virgin ♀	150	3	88.86	.	.
	DaGS > Gcn5 KD+ virgin ♀	150	7	78.68	< 1.0E-10	.
36D	Control (live yeast history + tween 80) ♀	178	0	70.10	.	.
	Oleic acid + acetic acid + valine history ♀	174	0	67.71	0.0243	.
36E	Control (live yeast history + tween 80) virgin ♀	105	5	69.11	.	.
	Oleic acid + acetic acid + valine history virgin ♀	118	1	67.96	0.1947	.

表 3. 酵母のメタボローム解析

コントロール酵母と *nat3Δ* 酵母のメタボローム解析結果。根拠論文
(<https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44319-025-00503-8>) の Dataset EV3 を参照。

表 4. *nat3Δ* 栄養履歴を持つ幼虫と成虫の RNA-seq 解析

コントロールおよび *nat3Δ* 栄養履歴を持つ、オスの幼虫全身と成虫全身の RNA-seq 解析結果。根拠論文 (<https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44319-025-00503-8>) の Dataset EV4 を参照。

表 5. *nat3Δ* 栄養履歴を持つキイロショウジョウバエのメタボローム解析

コントロールおよび *nat3Δ* 栄養履歴を持つ、オスの幼虫全身と成虫全身のメタボローム解析結果。根拠論文 (<https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44319-025-00503-8>) の Dataset EV5 を参照。

表 6. 幼虫の H3K9ac CUT&RUN 解析結果

オスの幼虫全身を用いた CUT&RUN 解析結果。根拠論文

(<https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44319-025-00503-8>) の Dataset EV6 を参照。

表 7. キイロショウジョウバエの CNS の RNA-seq 解析

オスの幼虫の中樞神経系 (CNS)、あるいは成虫の脳を用いた RNA-seq 解析結果。根拠論文 (<https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44319-025-00503-8>) の Dataset EV7 を参照。

表 8. 酵母の脂肪酸解析

コントロール酵母と *nat3Δ* 酵母の脂肪酸解析結果。根拠論文
(<https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44319-025-00503-8>) の Dataset EV8 を参照。

表 9. OVA 餌を食べた幼虫の RNA-seq 解析

コントロールおよび OVA 餌を食べたオスの幼虫全身の RNA-seq 解析結果。根拠論文 (<https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44319-025-00503-8>) の Dataset EV9 を参照。

表 10. 幼虫内のアセチル CoA 量 と CoA 量

コントロールおよび *nat3Δ* 餌を食べたオスの幼虫全身における、アセチル CoA と CoA の定量結果。根拠論文 (<https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44319-025-00503-8>) の Dataset EV10 を参照。

表 11. *Gcn5* をノックダウンされた幼虫の RNA-seq 解析

コントロールおよび *Gcn5* をノックダウンされた、雌雄それぞれの幼虫全身の RNA-seq 解析結果。根拠論文 (<https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44319-025-00503-8>) の Dataset EV11 を参照。

表 12. 統計解析の手法、 P 値、およびサンプルサイズ

本研究の統計解析結果の一覧。

には R を用い、有意水準は $P < 0.05$ とした。統計解析の詳細については 4.14. を参照。

Raw P value : Log-rank test による P 値。特筆しない限り、コントロールとの比較における検定結果を示している。

Adjusted P value : 多重比較補正後の P 値。多重比較の場合のみ記載。

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw P value	Adjusted P value
6B	Log-rank test	Live yeast history	240	.	.
		LSF history	240	< 1.0E-10	.
6C	Log-rank test	Live yeast history	90	.	.
		LSF history	190	0.0229	.
6D	Log-rank test	Live yeast history 2x	240	0.6852	1
		Control (live yeast history 1x)	240	.	.
		Live yeast history 1/2x	240	0.2522	0.5044
6E 8-R8	Log-rank test	Live yeast history 2x	109	0.3056	0.9169
		Control (live yeast history 1x)	90	.	.
		Live yeast history 1/2x	116	0.6823	1
		brp1 history	100	0.0013	0.0039
7-R1	No performed tests	Control	120	.	.
		crs5 history	120	.	.
		brp1 history	120	.	.
		pkp2 history	120	.	.
		cka2 history	120	.	.
		nat3 history	120	.	.
		vma11 history	120	.	.
		irc6 history	120	.	.
		mrx history	120	.	.
		aan1 history	120	.	.
		nrt1 history	120	.	.
		tps1 history	120	.	.
		ids2 history	120	.	.
		rrn4(2-60) history	120	.	.
		fur4 history	120	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
		nrp1 history	120	.	.
		dpp1 history	120	.	.
		rrn4(2_69) history	120	.	.
		ygr130c history	120	.	.
7-R2	No performed tests	Control	120	.	.
		tvp38 history	120	.	.
		rgi2 history	120	.	.
		tup1 history	120	.	.
		hrd3 history	120	.	.
		syf2 history	120	.	.
		fes1 history	120	.	.
		vma9 history	120	.	.
		shp1 history	120	.	.
		mid2 history	120	.	.
		swa2 history	120	.	.
		vma22 history	120	.	.
		ygl007c-a history	120	.	.
		ino2 history	120	.	.
		yor331c history	120	.	.
		opi9 history	120	.	.
		rpl42b history	120	.	.
		ser1 history	120	.	.
8-R1 9B	Log-rank test	Control	110	.	.
		tup1 history	89	0.5180	1
		cka2 history	118	0.7018	1
		swa2 history	98	0.1732	1
		mid2 history	117	0.7641	1
		pkp2 history	109	0.3147	1
		nat3 history	110	0.0012	0.0071
8-R2	Log-rank test	Control	80	.	.
		rrn4 history	140	0.4789	1
		syf2 history	110	0.693	1
		fes1 history	139	0.3511	1
		vma22 history	70	0.0254	0.1018

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
8-R3	Log-rank test	Control	90	.	.
		hrd3 history	110	0.3006	1
		shp1 history	110	0.4390	1
		ino2 history	70	0.7130	1
		tpv38 history	120	0.6585	1
		mrx14 history	140	0.1520	0.912
		vma9 history	48	0.3919	1
8-R4	Log-rank test	Control	80	.	.
		rgi2 history	70	0.2925	1
		nrt1 history	110	0.0838	0.3352
		fur4 history	80	0.241	0.9642
		tps1 history	150	0.4985	1
8-R5	Log-rank test	Control	36	.	.
		crs5 history	65	0.4163	1
		dpp1 history	129	0.2400	0.7199
		ygl007c-a history	80	0.3330	0.9989
8-R6	Log-rank test	Control	110	.	.
		irc6 history	107	0.9308	1
		ids2 history	120	0.0347	0.1388
		vma9 history	40	0.6042	1
		brp1 history	39	0.0055	0.0221
8-R7	Log-rank test	Control	77	.	.
		crs5 history	60	0.1480	0.592
		aan1 history	105	0.2147	0.8588
		nrp1 history	110	0.6786	1
		vma11 history	27	0.3288	1
9A	Log-rank test	Control	240	.	.
		nat3 history	240	< 1.0E-10	.
9C	Log-rank test	Control	140	.	.
		nat3 history	143	3.5E-08	.
9D	Student's t-test	Control	18	.	.
		nat3-fed	18	0.001002	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
9E	Two-tailed Mann-Whitney U test	Control (1 week old)	50	.	.
		nat3 history (1 week old)	50	0.00667	.
	Two-tailed Mann-Whitney U test	Control (5 weeks old)	42	.	.
		nat3 history (5 weeks old)	41	0.000895	.
9F	Student's t-test	Control (2 weeks old)	3	.	.
		nat3 history (2 week old)	3	0.9839	.
	Student's t-test	Control (3 weeks old)	3	.	.
		nat3 history (3 weeks old)	3	0.04084	.
10B	Likelihood-ratio test	Control (nvd)	3	.	.
		nat3-fed (nvd)	3	2.0E-11	2.5E-09
	Likelihood-ratio test	Control (spok)	3	.	.
		nat3-fed (spok)	3	8.2E-09	5.4E-07
	Likelihood-ratio test	Control (phm)	3	.	.
		nat3-fed (phm)	3	3.2E-07	1.4E-05
	Likelihood-ratio test	Control (dib)	3	.	.
		nat3-fed (dib)	3	1.4E-03	1.8E-02
12	Likelihood-ratio test	Control (sad)	3	.	.
		nat3-fed (sad)	3	7.8E-10	6.9E-08
	Likelihood-ratio test	Control (CG2051)	3	.	.
		nat3-fed (CG2051)	3	0.917968	0.990953
	Likelihood-ratio test	Control (Gcn5)	3	.	.
		nat3-fed (Gcn5)	3	0.273752	0.716954
	Likelihood-ratio test	Control (nej)	3	.	.
		nat3-fed (nej)	3	0.648338	0.920707
	Likelihood-ratio test	Control (Taf1)	3	.	.
		nat3-fed (Taf1)	3	0.624188	0.913733
		Control (Tip60)	3	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	Likelihood-ratio test	nat3-fed (Tip60)	3	0.807692	0.963756
	Likelihood-ratio test	Control (enok)	3	.	.
		nat3-fed (enok)	3	0.54854	0.88644
	Likelihood-ratio test	Control (chm)	3	.	.
		nat3-fed (chm)	3	0.148094	0.5542
	Likelihood-ratio test	Control (mof)	3	.	.
		nat3-fed (mof)	3	0.977988	0.99642
	Likelihood-ratio test	Control (Elp3)	3	.	.
		nat3-fed (Elp3)	3	0.831728	0.969499
	Likelihood-ratio test	Control (Atac2)	3	.	.
		nat3-fed (Atac2)	3	0.824169	0.968549
	Likelihood-ratio test	Control (Ada2a)	3	.	.
		nat3-fed (Ada2a)	3	0.747644	0.947973
15A	Hypergeometric test	Down peak intervals of nat3-fed	889454	0	.
		Down peak intervals of Gcn5 KD	1451090		
		Overlapped peak intervals	97442		
		All peak intervals of nat3-fed and Gcn5 KD	15443594		
15B	Hypergeometric test	Down peak-containing genes of nat3-fed	796	7.0E-28	.
		Down peak-containing genes of Gcn5 KD	1310		
		Overlapped genes	220		
		All peak-containing genes of nat3-fed and Gcn5 KD	9602		
17B	Student's t-test	DaGS > mCherry KD-	4	.	.
		DaGS > mCherry KD+	4	0.8595	.
	Student's t-test	DaGS > Gcn5 KD-	4	.	.
		DaGS > Gcn5 KD+	4	0.01407	.
17C		DaGS > Gcn5 KD-	4	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	Two-tailed Mann-Whitney U test	DaGS > Gcn5 KD+	4	0.6857	.
17D	Log-rank test	DaGS > mCherry KD-	960	.	.
		DaGS > mCherry KD+	960	0.5523	.
17E	Log-rank test	DaGS > Gcn5 KD-	960	.	.
		DaGS > Gcn5 KD+	960	0.0068	.
17F	Log-rank test	DaGS > mCherry KD-	200	.	.
		DaGS > mCherry KD+	200	0.3303	.
17G	Log-rank test	DaGS > Gcn5 KD-	200	.	.
		DaGS > Gcn5 KD+	200	< 1.0E-10	.
17H	Student's t-test	DaGS > Gcn5 KD-	18	.	.
		DaGS > Gcn5 KD+	19	1.3E-13	.
17I	Two-tailed Mann-Whitney U test	DaGS > Gcn5 KD-	5	.	.
		DaGS > Gcn5 KD+	5	0.007937	.
17J	Log-rank test	DaGS > Gcn5 KD- (0 μ M)	600	.	.
		DaGS > Gcn5 KD+ (5 μ M)	600	< 1.0E-10	< 1.0E-10
		DaGS > Gcn5 KD+ (10 μ M)	600	< 1.0E-10	< 1.0E-10
		DaGS > Gcn5 KD+ (20 μ M)	600	< 1.0E-10	< 1.0E-10
		5 μ M vs. 10 μ M		0.0949	0.2847
		5 μ M vs. 20 μ M		0.000013	0.000038
		10 μ M vs. 20 μ M		0.0063	0.019
17K	Log-rank test	DaGS > Gcn5 KD- (0 μ M)	200	.	.
		DaGS > Gcn5 KD+ (5 μ M)	200	< 1.0E-10	< 1.0E-10
		DaGS > Gcn5 KD+ (10 μ M)	200	< 1.0E-10	< 1.0E-10
		DaGS > Gcn5 KD+ (20 μ M)	200	< 1.0E-10	< 1.0E-10

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
		5 μ M vs. 10 μ M		0.7176	1
		5 μ M vs. 20 μ M		0.0002	0.0006
		10 μ M vs. 20 μ M		0.0011	0.0032
18B	Likelihood-ratio test	ElavGS > Gcn5 KD-	3	.	.
		ElavGS > Gcn5 KD+	3	7.4E-20	1.3E-17
18C	Log-rank test	ElavGS > Gcn5 KD-	600	.	.
		ElavGS > Gcn5 KD+	600	0.000008	.
18D	Log-rank test	TIGS > Gcn5 KD-	600	.	.
		TIGS > Gcn5 KD+	600	0.035	.
18E	Log-rank test	UroGS > Gcn5 KD-	600	.	.
		UroGS > Gcn5 KD+	600	0.7576	.
18F	Log-rank test	ElavGS > Gcn5 KD-	200	.	.
		ElavGS > Gcn5 KD+	200	< 1.0E-10	.
18G	Log-rank test	TIGS > Gcn5 KD-	200	.	.
		TIGS > Gcn5 KD+	200	0.1724	.
18H	Log-rank test	UroGS > Gcn5 KD-	200	.	.
		UroGS > Gcn5 KD+	200	0.4282	.
18I	Student's t-test	ElavGS > Gcn5 KD-	20	.	.
		ElavGS > Gcn5 KD+	19	1.11E-08	.
	Student's t-test	TIGS > Gcn5 KD-	15	.	.
		TIGS > Gcn5 KD+	16	0.1283	.
18J	Two-tailed Mann-Whitney U test	ElavGS > Gcn5 KD-	5	.	.
		ElavGS > Gcn5 KD+	5	0.007937	.
	Two-tailed Mann-Whitney U test	TIGS > Gcn5 KD-	5	.	.
		TIGS > Gcn5 KD+	5	0.8889	.
	Two-tailed Mann-Whitney U test	UroGS > Gcn5 KD-	5	.	.
		UroGS > Gcn5 KD+	5	0.3651	.
19A		Control (CG2051)	3	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	Likelihood-ratio test	nat3-fed (CG2051)	3	0.764786	0.999977
	Likelihood-ratio test	Control (Gcn5)	3	.	.
		nat3-fed (Gcn5)	3	0.918464	0.999977
	Likelihood-ratio test	Control (nej)	3	.	.
		nat3-fed (nej)	3	0.036962	0.811072
	Likelihood-ratio test	Control (Taf1)	3	.	.
		nat3-fed (Taf1)	3	0.859217	0.999977
	Likelihood-ratio test	Control (Tip60)	3	.	.
		nat3-fed (Tip60)	3	0.702656	0.999977
	Likelihood-ratio test	Control (enok)	3	.	.
		nat3-fed (enok)	3	0.868091	0.999977
	Likelihood-ratio test	Control (chm)	3	.	.
		nat3-fed (chm)	3	0.408814	0.999977
	Likelihood-ratio test	Control (mof)	3	.	.
		nat3-fed (mof)	3	0.862992	0.999977
	Likelihood-ratio test	Control (Elp3)	3	.	.
		nat3-fed (Elp3)	3	0.457324	0.999977
	Likelihood-ratio test	Control (Atac2)	3	.	.
		nat3-fed (Atac2)	3	0.660164	0.999977
19C	Likelihood-ratio test	Control (Tg)	3	.	.
		nat3-fed (Tg)	3	0.159192	0.999977
	Likelihood-ratio test	ElavGS > Gcn5 KD- (Tg)	3	.	.
		ElavGS > Gcn5 KD+ (Tg)	3	0.000114	0.001112

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
19D	Likelihood-ratio test	Control (Proc-R)	3	.	.
		nat3-fed (Proc-R)	3	0.031353	0.759201
	Likelihood-ratio test	ElavGS > Gcn5 KD- (Proc-R)	3	.	.
		ElavGS > Gcn5 KD+ (Proc-R)	3	2.1E-11	1.2E-09
19E	Likelihood-ratio test	Control (Eip78C-a)	3	.	.
		nat3-fed (Eip78C-a)	3	0.000129	0.018695
	Likelihood-ratio test	ElavGS > Gcn5 KD- (Eip78C-a)	3	.	.
		ElavGS > Gcn5 KD+ (Eip78C-a)	3	7.2E-11	3.5E-09
19F	Log-rank test	ElavGS > Tg KD-	200	.	.
		ElavGS > Tg KD+	200	< 1.0E-10	.
19G	Log-rank test	ElavGS > Proc-R KD-	200	.	.
		ElavGS > Proc-R KD+	200	9.9E-08	.
19H	Log-rank test	ElavGS > Eip78C-a OE-	193	.	.
		ElavGS > Eip78C-a OE+	200	0.3665	.
22B	Likelihood-ratio test	Control (CG12262)	3	.	.
		nat3-fed (CG12262)	3	0.000254	0.004554
	Likelihood-ratio test	Control (CG3902)	3	.	.
		nat3-fed (CG3902)	3	0.001536	0.019677
	Likelihood-ratio test	Control (CG9547)	3	.	.
		nat3-fed (CG9547)	3	0.003027	0.03426
	Likelihood-ratio test	Control (CG4860)	3	.	.
		nat3-fed (CG4860)	3	0.000331	0.005686
22C	Likelihood-ratio test	Control (CG9527)	3	.	.
		nat3-fed (CG9527)	3	0.00392	0.042454
	Likelihood-ratio test	Control (CG17544)	3	.	.
		nat3-fed (CG17544)	3	0.003649	0.040024

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	Likelihood-ratio test	Control (Acox57D-p)	3	.	.
		nat3-fed (Acox57D-p)	3	2.2E-07	1.0E-05
	Likelihood-ratio test	Control (Acox57D-d)	3	.	.
		nat3-fed (Acox57D-d)	3	3.1E-05	0.000763
22D	Likelihood-ratio test	Control (CG15829)	3	.	.
		nat3-fed (CG15829)	3	7.3E-35	1.2E-31
	Likelihood-ratio test	Control (Dbi)	3	.	.
		nat3-fed (Dbi)	3	2.4E-09	1.9E-07
	Likelihood-ratio test	Control (CG8628)	3	.	.
		nat3-fed (CG8628)	3	1.0E-07	5.1E-06
	Likelihood-ratio test	Control (CG5804)	3	.	.
		nat3-fed (CG5804)	3	6.8E-07	2.8E-05
22E	Likelihood-ratio test	Control (yip2)	3	.	.
		nat3-fed (yip2)	3	8.3E-07	3.3E-05
	Likelihood-ratio test	Control (Aldh)	3	.	.
		nat3-fed (Aldh)	3	0.001125	0.015321
	Likelihood-ratio test	Control (CG3961)	3	.	.
		nat3-fed (CG3961)	3	4.2E-08	2.3E-06
	Likelihood-ratio test	Control (CG4594)	3	.	.
		nat3-fed (CG4594)	3	9.1E-05	0.001936
22F	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Palmitoleic acid; (Z)16:1n-7)	3	.	.
		nat3 (Palmitoleic acid; (Z)16:1n-7)	3	0.000323	0.000539
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Palmitic acid; 16:0)	3	.	.
		nat3 (Palmitic acid; 16:0)	3	0.000175	0.000539
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Oleic acid; (Z)18:1n-9)	3	.	.
		nat3 (Oleic acid; (Z)18:1n-9)	3	0.000634	0.000793
		Control (Elaidic acid; (E)18:1n-9)	3	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	t-test provided by MetaboAnalyst	nat3 (Elaidic acid; (E)18:1n-9)	3	0.00090 3	0.000903
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Stearic acid; 18:0)	3	.	.
		nat3 (Stearic acid; 18:0)	3	0.00028	0.000539
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Capric acid; 10:0)	3	.	.
		nat3 (Capric acid; 10:0)	3	0.00028 1	0.000398
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Lauric acid; 12:0)	3	.	.
		nat3 (Lauric acid; 12:0)	3	0.00024 4	0.000398
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Myristoleic acid; (Z)14:1n-5)	3	.	.
		nat3 (Myristoleic acid; (Z)14:1n-5)	3	0.00055 8	0.00073
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Myristic acid; 14:0)	3	.	.
		nat3 (Myristic acid; 14:0)	3	2.4E-05	6.9E-05
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (cis-10-Pentadecenoic acid; (Z)15:1n-5)	3	.	.
		nat3 (cis-10-Pentadecenoic acid; (Z)15:1n-5)	3	0.00090 2	0.001034
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Pentadecanoic acid; 15:0)	3	.	.
		nat3 (Pentadecanoic acid; 15:0)	3	0.00019	0.000358
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Margaric acid; 17:0)	3	.	.
		nat3 (Margaric acid; 17:0)	3	0.00027 1	0.000398
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Nonadecanoic acid; 19:0)	3	.	.
		nat3 (Nonadecanoic acid; 19:0)	3	0.00091 3	0.001034
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (cis-11-Eicosenoic acid; (Z)20:1n-9)	3	.	.
		nat3 (cis-11-Eicosenoic acid; (Z)20:1n-9)	3	0.00015 4	0.000328
		Control (Arachidic acid; 20:0)	3	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	t-test provided by MetaboAnalyst	nat3 (Arachidic acid; 20:0)	3	3.2E-05	7.9E-05
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Behenic acid; 22:0)	3	.	.
		nat3 (Behenic acid; 22:0)	3	1.8E-05	6.9E-05
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Lignoceric acid; 24:0)	3	.	.
		Control (Lignoceric acid; 24:0)	3	1.0E-05	6.9E-05
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Pentacosanoic acid; 25:0)	3	.	.
		nat3 (Pentacosanoic acid; 25:0)	3	1.8E-05	6.9E-05
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Cerotic acid; 26:0)	3	.	.
		nat3 (Cerotic acid; 26:0)	3	7.8E-06	6.9E-05
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Heptacosanoic acid; 27:0)	3	.	.
		nat3 (Heptacosanoic acid; 27:0)	3	2.0E-05	6.9E-05
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Octacosanoic acid; 28:0)	3	.	.
		nat3 (Octacosanoic acid; 28:0)	3	0.004108	0.004108
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Nonacosanoic acid; 29:0)	3	.	.
		nat3 (Nonacosanoic acid; 29:0)	3	0.001282	0.001362
23A	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (V)	3	.	.
		nat3 (V)	3	0.00386	0.036227
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (I)	3	.	.
		nat3 (I)	3	0.011291	0.060537
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (F)	3	.	.
		nat3 (F)	3	0.13508	0.25775
		Control (L)	3	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	t-test provided by MetaboAnalyst	nat3 (L)	3	0.13506	0.25775
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (T)	3	.	.
		nat3 (T)	3	0.41697	0.53711
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (R)	3	.	.
		nat3 (R)	3	0.56569	0.64638
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (W)	3	.	.
		nat3 (W)	3	0.21284	0.337
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (K)	3	.	.
		nat3 (K)	3	0.10575	0.22883
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (M)	3	.	.
		nat3 (M)	3	0.06297 5	0.16022
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (H)	3	.	.
		nat3 (H)	3	0.02415 7	0.096627
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Y)	3	.	.
		nat3 (Y)	3	0.25512	0.36583
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (C)	3	.	.
		nat3 (C)	3	0.6894	0.75934
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (A)	3	.	.
		nat3 (A)	3	0.5054	0.59093
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (S)	3	.	.
		nat3 (S)	3	0.05399 2	0.16022
		Control (N)	3	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	t-test provided by MetaboAnalyst	nat3 (N)	3	0.01810 1	0.085979
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (G)	3	.	.
		nat3 (G)	3	0.00083 1	0.015794
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (P)	3	.	.
		Control (P)	3	0.00429	0.036227
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (D)	3	.	.
		nat3 (D)	3	0.00010 1	0.007668
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (E)	3	.	.
		nat3 (E)	3	0.00835 2	0.054582
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Q)	3	.	.
		nat3 (Q)	3	0.03106 8	0.11806
23C	Likelihood-ratio test	Control (scu)	3	.	.
		nat3-fed (scu)	3	2.5E-09	1.9E-07
	Likelihood-ratio test	Control (CG1673)	3	.	.
		nat3-fed (CG1673)	3	8.9E-06	2.7E-04
24A 24D	Log-rank test	Control (live yeast history + tween 80)	240	.	.
		Valine history	240	0.516	1
		Live yeast history	240	0.302	0.6039
24B 24F 26D 26E 26F	Log-rank test	Control (live yeast history + tween 80)	240	.	.
		Oleic acid history	240	5.6E-09	2.8E-08
		Oleic acid + valine history	240	< 1.0E- 10	< 1.0E-10
		Acetic acid history	240	0.0248	0.124
		Oleic acid + acetic acid history	240	< 1.0E- 10	< 1.0E-10
		Oleic acid + valine + acetic acid history	240	< 1.0E- 10	< 1.0E-10
	Log-rank test	Control (live yeast history + tween 80)	240	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
24C 24E 24G		1% Oleic acid history	240	< 1.0E-10	< 1.0E-10
		Valine + isoleucine history	240	0.198	0.5939
		Oleic acid + valine + isoleucine history	240	0.0005	0.0015
25A 25D	Log-rank test	Control (live yeast history + tween 80)	104	.	.
		Valine history	124	0.6877	1
		Live yeast history	90	0.9936	1
25B 25F 27A 27B 27C	Log-rank test	Control (live yeast history + tween 80)	143	.	.
		Oleic acid history	145	0.6989	1
		Oleic acid + valine history	85	0.3685	1
		Acetic acid history	107	0.7440	1
		Oleic acid + acetic acid history	69	0.0465	0.2323
		Oleic acid + valine + acetic acid history	74	0.0011	0.0053
25C 25E 25G	Log-rank test	Control (live yeast history + tween 80)	117	.	.
		1% Oleic acid history	60	0.3693	1
		Valine + isoleucine history	89	0.3353	1
		Oleic acid + valine + isoleucine history	150	0.1247	0.3741
26B	Likelihood-ratio test	Control	3	.	.
		nat3-fed	3	0.000791	0.011628
26C	Log-rank test	Control	120	.	.
		25 mM Acetic acid	120	0.0319	0.0638
		50 mM Acetic acid	120	8.5E-08	1.7E-07
		25 mM vs. 50 mM		0.0008	0.0017
27D	Log-rank test	Control (live yeast history + tween 80)	98	.	.
		Oleic acid + valine + acetic acid history	186	0.0011	.
28 (Extracellular)	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Acetic acid)	3	.	.
		nat3 (Acetic acid)	3	0.11326	0.15857
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Propionic acid)	3	.	.
		nat3 (Propionic acid)	3	0.23714	0.27666
		Control (Isobutyric acid)	3	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	t-test provided by MetaboAnalyst	nat3 (Isobutyric acid)	3	0.00398 1	0.013932
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Butyric acid)	3	.	.
		nat3 (Butyric acid)	3	0.01318 5	0.030765
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (2-Methylbutyric acid)	3	.	.
		nat3 (2-Methylbutyric acid)	3	0.3473	0.3473
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Isovaleric acid)	3	.	.
		nat3 (Isovaleric acid)	3	0.02541 2	0.044471
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Caproic acid)	3	.	.
		nat3 (Caproic acid)	3	0.00287 2	0.013932
28 (Intracellular)	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Acetic acid)	3	.	.
		nat3 (Acetic acid)	3	3.9E-05	2.7E-04
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Propionic acid)	3	.	.
		nat3 (Propionic acid)	3	0.10974	0.19205
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Isobutyric acid)	3	.	.
		nat3 (Isobutyric acid)	3	0.2867	0.40138
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Butyric acid)	3	.	.
		nat3 (Butyric acid)	3	0.48938	0.48938
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (2-Methylbutyric acid)	3	.	.
		nat3 (2-Methylbutyric acid)	3	0.00962 6	0.033692
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (Isovaleric acid)	3	.	.
		nat3 (Isovaleric acid)	3	0.02778 4	0.06483
		Control (Caproic acid)	3	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	t-test provided by MetaboAnalyst	nat3 (Caproic acid)	3	0.43136	0.48938
29A	Hypergeometric test	Up genes in OVA-fed	1058	0	.
		Up genes in nat3-fed	693		
		Overlapped genes	527		
		All detected genes of OVA-fed and nat3-fed	11892		
29B	Hypergeometric test	Down genes in OVA-fed	502	0	.
		Down genes in nat3-fed	427		
		Overlapped genes	295		
		All detected genes of OVA-fed and nat3-fed	11892		
30A	Likelihood-ratio test	Control	3	.	.
		OVA-fed	3	7.2E-16	1.1E-13
30B	Likelihood-ratio test	Control (CG12262)	3	.	.
		OVA-fed (CG12262)	3	1.8E-08	7.8E-07
	Likelihood-ratio test	Control (CG7461)	3	.	.
		OVA-fed (CG7461)	3	0.000609	0.006625
	Likelihood-ratio test	Control (CG3902)	3	.	.
		OVA-fed (CG3902)	3	0.000997	0.010144
	Likelihood-ratio test	Control (Arc42)	3	.	.
		OVA-fed (Arc42)	3	0.003493	0.029062
	Likelihood-ratio test	Control (CG4860)	3	.	.
		OVA-fed (CG4860)	3	1.9E-05	0.000381
30C	Likelihood-ratio test	Control (CG9527)	3	.	.
		OVA-fed (CG9527)	3	3.2E-07	1.1E-05
	Likelihood-ratio test	Control (Acox57D-p)	3	.	.
		OVA-fed (Acox57D-p)	3	1.6E-06	4.3E-05
	Likelihood-ratio test	Control (Acox57D-d)	3	.	.
		OVA-fed (Acox57D-d)	3	1.2E-17	2.4E-15
		Control (CG4586)	3	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	Likelihood-ratio test	OVA-fed (CG4586)	3	0.004175	0.033849
30D	Likelihood-ratio test	Control (CG5804)	3	.	.
		OVA-fed (CG5804)	3	2.8E-25	1.3E-22
	Likelihood-ratio test	Control (Dbi)	3	.	.
		OVA-fed (Dbi)	3	5.7E-12	4.8E-10
	Likelihood-ratio test	Control (CG15829)	3	.	.
		OVA-fed (CG15829)	3	0.000436	0.005037
	Likelihood-ratio test	Control (CG8628)	3	.	.
		OVA-fed (CG8628)	3	4.7E-09	2.3E-07
	Likelihood-ratio test	Control (CG8814)	3	.	.
		OVA-fed (CG8814)	3	0.001604	0.015132
	Likelihood-ratio test	Control (CG8629)	3	.	.
		OVA-fed (CG8629)	3	0.002372	0.021065
30E	Likelihood-ratio test	Control (yip2)	3	.	.
		OVA-fed (yip2)	3	6.1E-10	3.7E-08
	Likelihood-ratio test	Control (whd)	3	.	.
		OVA-fed (whd)	3	0.00014	0.001993
	Likelihood-ratio test	Control (Thiolase)	3	.	.
		OVA-fed (Thiolase)	3	0.000131	0.001874
	Likelihood-ratio test	Control (Mtpalpha)	3	.	.
		OVA-fed (Mtpalpha)	3	0.000409	0.004768
	Likelihood-ratio test	Control (CG6543)	3	.	.
		OVA-fed (CG6543)	3	0.002371	0.021065
	Likelihood-ratio test	Control (Aldh)	3	.	.
		OVA-fed (Aldh)	3	5.4E-05	0.000891
	Likelihood-ratio test	Control (CG3961)	3	.	.
		OVA-fed (CG3961)	3	1.9E-09	1.0E-07

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	Likelihood-ratio test	Control (CG4598)	3	.	.
		OVA-fed (CG4598)	3	9.2E-08	3.5E-06
	Likelihood-ratio test	Control (CG4500)	3	.	.
		OVA-fed (CG4500)	3	3.1E-11	2.3E-09
	Likelihood-ratio test	Control (Acsl)	3	.	.
		OVA-fed (Acsl)	3	0.000329	0.003993
	Likelihood-ratio test	Control (CG13890)	3	.	.
		OVA-fed (CG13890)	3	2.1E-05	0.00041
	Likelihood-ratio test	Control (CG2107)	3	.	.
		OVA-fed (CG2107)	3	0.001876	0.017305
	Likelihood-ratio test	Control (CG4594)	3	.	.
		OVA-fed (CG4594)	3	3.0E-06	7.3E-05
30F	Likelihood-ratio test	Control (scu)	3	.	.
		OVA-fed (scu)	3	6.1E-17	1.1E-14
	Likelihood-ratio test	Control (CG17896)	3	.	.
		OVA-fed (CG17896)	3	5.0E-06	0.000115
	Likelihood-ratio test	Control (CG15093)	3	.	.
		OVA-fed (CG15093)	3	2.1E-07	7.3E-06
	Likelihood-ratio test	Control (CG1673)	3	.	.
		OVA-fed (CG1673)	3	4.7E-05	0.000797
32	Likelihood-ratio test	Control (CG2051)	3	.	.
		OVA-fed (CG2051)	3	0.518367	0.942914
	Likelihood-ratio test	Control (Gcn5)	3	.	.
		OVA-fed (Gcn5)	3	0.322473	0.810071
	Likelihood-ratio test	Control (nej)	3	.	.
		OVA-fed (nej)	3	0.352746	0.839828

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	Likelihood-ratio test	Control (Taf1)	3	.	.
		OVA-fed (Taf1)	3	0.734385	0.972932
	Likelihood-ratio test	Control (Tip60)	3	.	.
		OVA-fed (Tip60)	3	0.636207	0.962364
	Likelihood-ratio test	Control (enok)	3	.	.
		OVA-fed (enok)	3	0.808765	0.979693
	Likelihood-ratio test	Control (chm)	3	.	.
		OVA-fed (chm)	3	0.542711	0.949515
	Likelihood-ratio test	Control (mof)	3	.	.
		OVA-fed (mof)	3	0.276073	0.755742
	Likelihood-ratio test	Control (Elp3)	3	.	.
		OVA-fed (Elp3)	3	0.907771	0.992493
	Likelihood-ratio test	Control (Atac2)	3	.	.
		OVA-fed (Atac2)	3	0.849735	0.984828
	Likelihood-ratio test	Control (Ada2a)	3	.	.
		OVA-fed (Ada2a)	3	0.788442	0.976744
33C	Hypergeometric test	Down peak intervals of OVA-fed	194400	0	.
		Down peak intervals of nat3-fed	889454		
		Overlapped peak intervals	15944		
		All peak intervals of OVA-fed and nat3-fed	15336790		
	Hypergeometric test	Down peak intervals of OVA-fed	194400	1	.
		Down peak intervals of Gcn5 KD	1451090		
		Overlapped peak intervals	8515		
		All peak intervals of OVA-fed and Gcn5 KD	14549267		
33D		Down peak-containing genes of OVA-fed	224	1.2E-15	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	Hypergeometric test	Down peak-containing genes of nat3-fed	796		
		Overlapped genes	58		
		All peak-containing genes of OVA-fed and nat3-fed	9626		
	Hypergeometric test	Down peak-containing genes of OVA-fed	224	0.003821	.
		Down peak-containing genes of Gcn5 KD	1310		
		Overlapped genes	46		
		All peak-containing genes of OVA-fed and Gcn5 KD	9405		
34A	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (LC-MS/MS)	5	.	.
		nat3-fed (LC-MS/MS)	5	8.7E-07	6.6E-05
	t-test provided by MetaboAnalyst	Control (CE-MS)	3	.	.
		nat3-fed (CE-MS)	3	0.001249	0.064922
34B	t-test provided by MetaboAnalyst	Control	3	.	.
		nat3	3	0.16475	0.29118
35A	Two-tailed Mann-Whitney U test	Control	5	.	.
		nat3-fed	5	1	1
35B	Two-tailed Mann-Whitney U test	Control	5	.	.
		nat3-fed	5	0.01587	.
35C	Two-tailed Mann-Whitney U test	Control	5	.	.
		nat3-fed	5	0.007937	.
35D	Likelihood-ratio test	Control	3	.	.
		nat3-fed	3	1.2E-08	7.7E-07
	Likelihood-ratio test	Control (live yeast + tween 80)	3	.	.
		OVA-fed	3	7.2E-07	2.1E-05
35F	Two-tailed Mann-Whitney U test	Control (C14:1)	5	.	.
		nat3 (C14:1)	5	0.007937	.
		Control (C14:0)	5	.	.

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
	Two-tailed Mann-Whitney U test	nat3 (C14:0)	5	0.5476	.
	Two-tailed Mann-Whitney U test	Control (C16:1)	5	.	.
		nat3 (C16:1)	5	0.03175	.
	Two-tailed Mann-Whitney U test	Control (C16:0)	5	.	.
		nat3 (C16:0)	5	0.01587	.
	Two-tailed Mann-Whitney U test	Control (C18:1)	5	.	.
		nat3 (C18:1)	5	0.1508	.
	Two-tailed Mann-Whitney U test	Control (C18:0)	5	.	.
		nat3 (C18:0)	5	0.01587	.
36A	Log-rank test	Control ♀	270	.	.
		nat3 history ♀	199	0.3527	.
36B	Log-rank test	DaGS > Gcn5 KD- ♀	150	.	.
		DaGS > Gcn5 KD+ ♀	150	< 1.0E-10	.
36C	Log-rank test	DaGS > Gcn5 KD- virgin ♀	150	.	.
		DaGS > Gcn5 KD+ virgin ♀	150	< 1.0E-10	.
36D	Log-rank test	Control (live yeast history + tween 80) ♀	178	.	.
		Oleic acid + acetic acid + valine history ♀	174	0.0243	.
36E	Log-rank test	Control (live yeast history + tween 80) virgin ♀	105	.	.
		Oleic acid + acetic acid + valine history virgin ♀	118	0.1947	.
37A	Hypergeometric test	Up genes in Gcn5 KD ♂	1534	6.8E-05	.
		Up genes in Gcn5 KD ♀	730		
		Overlapped genes	132		
		All detected genes of Gcn5 KD ♂♀	11620		
	Hypergeometric test	Down genes in Gcn5 KD ♂	889	0	.
		Down genes in Gcn5 KD ♀	1289		
		Overlapped genes	785		

Fig.	Test	Condition	Sample size	Raw <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
		All detected genes of Gen5 KD ♂♀	11620		
37B	Hypergeometric test	Up genes in OVA-fed ♂	1058	0	.
		Up genes in OVA-fed ♀	1264		
		Overlapped genes	800		
		All detected genes of OVA-fed ♂♀	11829		
	Hypergeometric test	Down genes in OVA-fed ♂	502	0	.
		Down genes in OVA-fed ♀	495		
		Overlapped genes	338		
		All detected genes of OVA-fed ♂♀	11829		

表 13. mSCM の組成

(A) mSCM を作る際に用いる各試薬の量 (4.3.1.)。 (B) CSM に含まれる成分と、mSCM 中での最終濃度。 (C) YNB に含まれる成分と、mSCM 中での最終濃度。(水谷、2020 より抜粋、一部改変。)

A

Modified Synthetic Complete Medium (mSCM)	g/L	製造元 製品番号
Complete Supplement Mixture (CSM)	0.79	Sunrise Science Products, 1001-010
Yeast Nitrogen Base (YNB)	1.71	Sunrise Science Products, 1500-100
硫酸アンモニウム	5	ナカライテスク, 02620-75
グルコース	60	ナカライテスク, 16806-25
寒天	20	ナカライテスク, 01162-15

B

Complete Supplement Mixture (CSM)	mg/L
Adenine hemisulfate	10
L-Arginine	50
L-Aspartic acid	80
L-Histidine hydrochloride monohydrate	20
L-Isoleucine	50
L-Leucine	100
L-Lysine hydrochloride	50
L-Methionine	20
L-Phenylalanine	50
L-Threonine	100
L-Tryptophan	50
L-Tyrosine	50
L-Valine	140
Uracil	20

C

Yeast Nitrogen Base (YNB)	mg/L
Biotin	0.002
Boric acid	0.5
Calcium chloride dihydrate	100
Copper (II) sulfate pentahydrate	0.04
Folic acid	0.002
Inositol (In Base Formula)	2
Iron (III) chloride	0.2
Magnesium sulfate anhydrous	500
Manganese sulfate monohydrate	0.4
Niacin	0.4
4-Aminobenzoic acid (PABA) (In Base Formula)	0.2
D-Pantothenic acid hemicalcium salt	0.4
Potassium iodide	0.1
Potassium phosphate monobasic anhydrous	1000
Pyridoxine hydrochloride	0.4
Riboflavin	0.2
Sodium chloride	100
Sodium molybdate	0.2
Thiamine hydrochloride	0.4
Zinc sulfate monohydrate	0.4

引用文献

- Adeva-Andany MM, López-Maside L, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C, Sixto-Leal C (2017) Enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism in humans. *Amino Acids* 49: 1005–1028
- Ahmad K, Spens AE (2019) Separate Polycomb Response Elements control chromatin state and activation of the vestigial gene. *PLoS Genetics* 15: 1–21
- Aksnes H, Drazic A, Marie M, Arnesen T (2016) First Things First: Vital Protein Marks by N-Terminal Acetyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences* 41: 746–760
- Albaugh BN, Arnold KM, Denu JM (2011) KAT(ching) Metabolism by the Tail: Insight into the Links between Lysine Acetyltransferases and Metabolism. *ChemBioChem* 12: 290–298
- Ali YO, Escala W, Ruan K, Zhai RG (2011) Assaying locomotor learning and memory deficits in Drosophila models of neurodegeneration. *Journal of Visualized Experiments* 49: 1–6
- Austad SN, Fischer KE (2016) Sex Differences. in *Lifespan Cell Metabolism* 23 1022–1033
- Barker DJP, Thornburg KL (2013) The obstetric origins of health for a lifetime. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 56: 511–519
- Bhutta ZA, Berkley JA, Bandsma RHJ, Kerac M, Trehan I, Briend A (2017) Severe childhood malnutrition. *Nature Reviews Disease Primers* 3: 17067
- Blank L M, Kuepfer L, Sauer U (2005) Large-scale ^{13}C -flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast 6: 1–16
- Blewitt M, Whitelaw E (2013) The use of mouse models to study epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Biol. 5.
- Bos M, Burnet B, Farrow R, Woods RA (1976) Development of Drosophila on sterol mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetical Research* 28: 163–176
- Brankatschk M, Eaton S (2010) Lipoprotein particles cross the blood-brain barrier in Drosophila. *Journal of Neuroscience* 30: 10441–10447
- Brown J B, Boley N, Eisman R, May GE, Stoiber MH, Duff MO, Booth BW, Wen J, Park S, Suzuki AM, et al. (2014) Diversity and dynamics of the Drosophila transcriptome. *Nature* 512: 393–399
- Brownell J E, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth S Y, Allis CD (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84: 843–851

- Caesar R, Blomberg A (2004) The stress-induced Tfs1p requires NatB-mediated acetylation to inhibit carboxypeptidase Y and to regulate the protein kinase A pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279: 38532–38543
- Caesar R, Warringer J, Blomberg A (2006) Physiological importance and identification of novel targets for the N-terminal acetyltransferase NatB. *Eukaryotic Cell* 5: 368–378
- Carré C, Ciurciu A, Komonyi O, Jacquier C, Fagegaltier D, Pidoux J, Tricoire H, Boros IM, Antoniewski C (2008) The Drosophila NURF remodelling and the ATAC histone acetylase complexes functionally interact and are required for global chromosome organization. *EMBO Reports* 9: 187–192
- Carré C, Szymczak D, Pidoux J, Antoniewski C (2005) The Histone H3 Acetylase dGcn5 Is a Key Player in Drosophila melanogaster Metamorphosis. *Molecular and Cellular Biology* 25: 8228–8238
- Carrer A, Parris JLD, Trefely S, Henry RA, Montgomery DC, Torres A, Viola JM, Kuo Y-M, Bair IA, Meier JL, et al. (2017) Impact of a high-fat diet on tissue Acyl-CoA and histone acetylation levels. *Journal of Biological Chemistry* 292: 3312–3322
- Cavalli G, Heard E (2019) Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature* 571: 489–499
- Cherry JM, Hong EL, Amundsen C, Balakrishnan R, Binkley G, Chan ET, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engle SR, et al. (2012) Saccharomyces Genome Database: The genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research* 40: 700–705
- Ciurciu A, Komonyi O, Pankotai T, Boros IM (2006) The Drosophila Histone Acetyltransferase Gcn5 and Transcriptional Adaptor Ada2a Are Involved in Nucleosomal Histone H4 Acetylation. *Molecular and Cellular Biology* 26: 9413–9423.
- Cluntun AA, Huang H, Dai L, Liu X, Zhao Y, Locasale JW (2015) The rate of glycolysis quantitatively mediates specific histone acetylation sites. *Cancer Metabolism* 3: 1–12
- Cohen J (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement* 20: 37–46
- Contreras EG, Sierralta J (2022) The Fly Blood-Brain Barrier Fights Against Nutritional Stress. *Neuroscience Insights* 17.
- Croft T, Raj C JT, Salemi M, Phinney BS, Lin SJ (2018) A functional link between NAD⁺ homeostasis and N-terminal protein acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 293: 2927–2938

- Dai Z, Ramesh V, Locasale JW (2020) The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. *Nature Reviews Genetics* 21: 737–753
- Dent S YR (2024) KAT Tales: Functions of Gcn5 and PCAF lysine acetyltransferases in SAGA and ATAC. *Journal of Biological Chemistry* 300: 107744
- Droujinine IA, Perrimon N (2016) Interorgan Communication Pathways in Physiology: Focus on *Drosophila*. *Annual Review of Genetics* 50: 539–570
- Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJP (1999) Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: Longitudinal study. *British Medical Journal* 318: 427–431
- Etchegaray JP, Mostoslavsky R (2016) Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes. *Molecular Cell* 62: 695–711
- Feller C, Forné I, Imhof A, Becker PB (2015) Global and specific responses of the histone acetylome to systematic perturbation. *Molecular Cell* 57: 559–571
- Fuse N, Okamori C, Okaji R, Tang C, Hirai K, Kurata S (2022) Transcriptome features of innate immune memory in *Drosophila*. *PLoS Genetics* 18: 1–24
- Gilbert SF, Barresi MJF (2016) Developmental Biology. 11th ed. In *Chapter 24 “The Developmental Origins of Adult Human Disease”*, Oxford University Press
- Gillette CM, Tennessen JM, Reis T. (2021). Balancing energy expenditure and storage with growth and biosynthesis during *Drosophila* development. *Developmental Biology*. 475, 234–244.
- Gramates LS, Agapite J, Attrill H, Calvi BR, Crosby MA, dos Santos G, Goodman JL, Goutte-Gattat D, Jenkins VK, Kaufman T, et al. (2022) FlyBase: a guided tour of highlighted features. *Genetics* 220: iyac035
- Grandison RC, Wong R, Bass TM, Partridge L, Piper MDW (2009) Effect of a standardised dietary restriction protocol on multiple laboratory strains of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 4: e4067
- Grangeteau C, Yahou F, Everaerts C, Dupont S, Farine JP, Beney L, Ferveur JF (2018) Yeast quality in juvenile diet affects *Drosophila melanogaster* adult life traits. *Scientific Reports* 8: 1–9
- Han SK, Lee D, Lee H, Kim D, Son HG, Yang JS, Lee S-JV, Kim S (2016) OASIS 2: Online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget* 7: 56147–56152
- Hanson MA, Gluckman PD (2014) Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiological Reviews* 94: 1027–1076

- Helbig AO, Rosati S, Pijnappel PWW, van Breukelen B, Timmers MHTH, Mohammed S, Sliiper M, Heck AJR (2010) Perturbation of the yeast N-acetyltransferase NatB induces elevation of protein phosphorylation levels. *BMC Genomics* 11: 685
- Hirabayashi S, Baranski TJ, Cagan RL (2013) XTransformed drosophila cells evade diet-mediated insulin resistance through wingless signaling. *Cell* 154: 664–675.
- Hu CK, Wang W, Brind'Amour J, Singh PP, Adam Reeves G, Lorincz MC, Alvarado AS, Brunet A (2020) Vertebrate diapause preserves organisms long term through Polycomb complex members. *Science* 367: 870–874
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4: 44–57
- Hulsen T, de Vlieg J, Alkema W (2008) BioVenn - A web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* 9: 1–6
- Iwasaki M, Kajiwarra T, Yasui Y, Yoshitake Y, Miyazaki M, Kawamura S, Suetsugu N, Nishihama R, Yamaoka S, Wanke D, et al. (2021) Identification of the sex-determining factor in the liverwort *Marchantia polymorpha* reveals unique evolution of sex chromosomes in a haploid system. *Current Biology* 31: 5522–5532e7
- Jirtle RL, Skinner MK (2007) Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics* 8: 253–262
- Johnson EC, Garczynski SF, Park D, Crim JW, Nässel DR, Taghert PH (2003) Identification and characterization of a G protein-coupled receptor for the neuropeptide proctolin in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6198–6203
- Kajihata S, Matsuda F, Yoshimi M, Hayakawa K, Furusawa C, Kanda A, Shimizu H (2015) C-based metabolic flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* with a reduced Crabtree effect. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 120: 140–144
- Kanaoka Y, Onodera K, Watanabe K, Hayashi Y, Usui T, Uemura T, Hattori Y (2023) Inter-organ Wingless/Ror/Akt signaling regulates nutrient-dependent hyperarborization of somatosensory neurons. *ELife* 12: 1–30
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M (2012) KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research* 40: 109–114
- Kaneko H, Ito T (1971) The Lipids of Yeasts *Yushi-Kagaku Kyokai-Shi* 20: 687–694

- Katan-Khaykovich Y, Struhl K (2002) Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: Rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. *Genes and Development* 16: 743–752
- Kharchenko PV, Alekseyenko AA, Schwartz YB, Minoda A, Riddle NC, Ernst J, Sabo PJ, Larschan E, Gorchakov AA, Gu T, et al. (2011) Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471: 480–486
- Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL (2019) Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology* 37: 907–915
- Kimura I, Ichimura A, Ohue-Kitano R, Igarashi M (2020) Free fatty acid receptors in health and disease. *Physiological Reviews* 100: 171–210
- Kinnaird A, Zhao S, Wellen KE, Michelakis ED (2016) Metabolic control of epigenetics in cancer. *Nature Reviews Cancer* 16: 694–707
- Kounatidis I, Chtarbanova S, Cao Y, Hayne M, Jayanth D, Ganetzky B, Ligoxygakis P (2017) NF- κ B Immunity in the Brain Determines Fly Lifespan in Healthy Aging and Age-Related Neurodegeneration. *Cell Reports* 19: 836–848
- Kramer AC, Jansson T, Bale TL, Powell TL (2023) Maternal-fetal cross-talk via the placenta: influence on offspring development and metabolism. *Development* 150: dev202088
- Kulkarni RA, Montgomery DC, Meier JL (2019) Epigenetic regulation by endogenous metabolite pharmacology. *Current Opinion in Chemical Biology* 51: 30–39
- Kuo M, Brownell JE, Sobel RE, Ranalli TA, Cook RG, Edmondson DG, Allis CD (1996) Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383: 269–272
- Landis JR, Koch GG (1977) The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 33: 159
- Langley-Evans SC (2015) Nutrition in early life and the programming of adult disease: A review. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 28: 1–14
- Langmead B, Salzberg S L (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357–359
- Larkin A, Marygold SJ, Antonazzo G, Attrill H, dos Santos G, Garapati PV, Goodman JL, Gramates LS, Millbum G, Strelets VB, et al. (2021) FlyBase: Updates to the *Drosophila melanogaster* knowledge base. *Nucleic Acids Research* 49: D899–D907
- Leader DP, Krause SA, Pandit A, Davies SA, Dow J AT (2018) FlyAtlas 2: A new version of the *Drosophila melanogaster* expression atlas with RNA-Seq miRNA-Seq and sex-specific data. *Nucleic Acids Research* 46: D809–D815

- Lee JV, Carrer A, Shah S, Snyder NW, Wei S, Venneti S, Worth AJ, Yuan Z-F, Lim H-W, Liu S, et al. (2014) Akt-dependent metabolic reprogramming regulates tumor cell Histone acetylation. *Cell Metabolism* 20: 306–319
- Leonardi R, Zhang YM, Rock CO, Jackowski S (2005) Coenzyme A: Back in action. *Progress in Lipid Research* 44: 125–153
- Leulier F, MacNeil LT, Lee W jae Rawls JF, Cani PD, Schwarzer M, Zhao L, Simpson SJ (2017) Integrative Physiology: At the Crossroads of Nutrition Microbiota Animal Physiology and Human Health. *Cell Metabolism* 25: 522–534
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, et al. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078–2079
- Li X, Egervari G, Wang Y, Berger SL, Lu Z (2018) Regulation of chromatin and gene expression by metabolic enzymes and metabolites. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19: 563–578
- Linford NJ, Bilgir C, Ro J, Pletcher SD (2013) Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Visualized Experiments* 71:1–9
- Lloret-Illinares M, Carré C, Vaquero A, de Olano N, Azorín F (2008) Characterization of *Drosophila melanogaster* JmjC+N histone demethylases. *Nucleic Acids Research* 36: 2852–2863
- Mann G, Mora S, Madu G, Adegoke OAJ (2021) Branched-chain Amino Acids: Catabolism in Skeletal Muscle and Implications for Muscle and Whole-body Metabolism. *Frontiers in Physiology* 12: 702826
- Maruyama T, Matsui S, Kobayashi R, Horii T, Oguri Y, Tsuzuki S, Horie T, Ono K, Hatada I, Sasaki T (2024) Medium-chain triglyceride-specific appetite is regulated by the β -oxidation of medium-chain fatty acids in the liver. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 326: E735–E746
- Matsuo N, Nagao K, Suito T, Juni N, Kato U, Hara Y, Umeda M (2019) Different mechanisms for selective transport of fatty acids using a single class of lipoprotein in *Drosophila* *Journal of Lipid Research* 60: 1199–1211
- Mattila J, Hietakangas V (2017) Regulation of carbohydrate energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 207: 1231–1253
- McCarthy D J, Chen Y, Smyth GK (2012) Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Research* 40: 4288–4297

- Meers MP, Bryson TD, Henikoff JG, Henikoff S (2019) Improved cut&run chromatin profiling tools. *ELife* 8: 1–16
- Miao T, Kim J, Kang P, Fujiwara H, Hsu FF, Bai H. (2022) Acetyl-CoA-mediated autoacetylation of fatty acid synthase as a metabolic switch of de novo lipogenesis in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119: e2212220119.
- Miguel-Aliaga I, Jasper H, Lemaitre B (2018) Anatomy and physiology of the digestive tract of *drosophila melanogaster*. *Genetics* 210: 357–396
- Millington JW, Biswas P, Chao C, Xia YH, Wat LW, Brownrigg GP, Sun Z, Basner-Collins, PJ, Geltink RIK, Rideout EJ (2022) A low-sugar diet enhances *Drosophila* body size in males and females via sex-specific mechanisms. *Development* 149: dev200491
- Montgomery DC, Garlick JM, Kulkarni RA, Kennedy S, Allali-Hassani A, Kuo YM, Andrews AJ, Wu H, Vedadi M, Meier JL (2016) Global Profiling of Acetyltransferase Feedback Regulation. *Journal of the American Chemical Society* 138: 6388–6391
- Montgomery DC, Sorum A W, Guasch L, Nicklaus M C, Meier JL (2015) Metabolic Regulation of Histone Acetyltransferases by Endogenous Acyl-CoA Cofactors. *Chemistry and Biology* 22: 1030–1039
- Montgomery SA, Tanizawa Y, Galik B, Wang N, Ito T, Mochizuki T, Akimcheva S, Bowman JL, Cognat V, Maréchal-Drouard L, et al. (2020) Chromatin Organization in Early Land Plants Reveals an Ancestral Association between H3K27me3 Transposons and Constitutive Heterochromatin. *Current Biology* 30: 573-588e7
- Moosecker S, Pissioti A, Leidmaa E, Harb MR, Dioli C, Gassen NC, Yu S, Gazea M, Catania C, Anderzhanova E, et al. (2021) Brain Expression, Physiological Regulation and Role in Motivation and Associative Learning of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ . *Neuroscience* 479: 91–106.
- Mülleider M, Calvani E, Alam MT, Wang R K, Eckerstorfer F, Zelezniak A, Ralser M (2016) Functional Metabolomics Describes the Yeast Biosynthetic Regulome. *Cell* 167: 553-565e12
- Mure A, Sugiura Y, Maeda R, Honda K, Sakurai N, Takahashi Y, Watada M, Katoh T, Gotoh A, Gotoh Y, et al. (2023) Identification of key yeast species and microbe–microbe interactions impacting larval growth of *Drosophila* in the wild. *ELife* 12: 1–63
- Neinast M, Murashige D, Arany Z (2019) Branched chain amino acids. *Annual Reviews of Physiology* 81: 139–164
- Niwa YS, Niwa R (2016) Ouija board: A transcription factor evolved for only one target in steroid hormone biosynthesis in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Transcription* 7: 196–202

- Oleson BJ, Bazopoulou D, Jakob U (2021) Shaping longevity early in life: developmental ROS and H3K4me3 set the clock. *Cell Cycle* 20: 2337–2347
- Osterwalder T, Yoon KS, White BH, Keshishian H (2001) A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 12596–12601
- Ozanne SE, & Hales CN (2004) Catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 427: 411–412
- Pang Z, Chong J, Zhou G, De Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, Gauthier C, Jacques P-E, Li S, Xia J (2021) MetaboAnalyst 50: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research* 49: W388–W396
- Pankotai T, Popescu C, Martín D, Grau B, Zsindely N, Bodai L, Tora L, Boros I (2010) Genes of the Ecdysone Biosynthesis Pathway Are Regulated by the dATAC Histone Acetyltransferase Complex in *Drosophila*. *Molecular and Cellular Biology* 30: 4254–4266
- Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Madeo F, Kroemer G (2015) Acetyl coenzyme A: A central metabolite and second messenger. *Cell Metabolism* 21: 805–821
- Piper MDW, Partridge L (2016) Protocols to Study Aging in *Drosophila*. In *Methods in Molecular Biology*, Dahmann C (ed) pp 291–302. Springer Nature: Humana Press
- Piper MDW, Partridge L (2018) *Drosophila* as a model for ageing. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1864: 2707–2717
- Piper MDW, Soultoukis GA, Blanc E, Mesaros A, Herbert SL, Juricic P, He X, Atanassov I, Salmonowicz H, Yang M, et al. (2017) Matching Dietary Amino Acid Balance to the In Silico-Translated Exome Optimizes Growth and Reproduction without Cost to Lifespan. *Cell Metabolism* 25: 610–621
- Polevoda B, Norbeck J, Takakura H, Blomberg A, Sherman F (1999) Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 18: 6155–6168
- Putri GH, Anders S, Pyl PT, Pimanda JE, Zanini F (2022) Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 20. *Bioinformatics* 38: 2943–2945
- R Core Team (2020) The R Project for Statistical Computing The R Project for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.R-project.org/>
- Ramírez F, Ryan DP, Grüning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, Heyne S, Dündar F, Manke T (2016) deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research* 44: W160–W165

- Reid MA, Dai Z, Locasale JW (2017) The impact of cellular metabolism on chromatin dynamics and epigenetics. *Nature Cell Biology* 19: 1298–1306
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander E S, Getz G, Mesirov J P (2011) Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 29: 24–26
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2009) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139–140
- Roman G, Endo K, Zong L, Davis RL (2001) P{switch} a system for spatial and temporal control of gene expression in drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 12602–12607
- Sadeghi L, Bonilla C, Strålfors A, Ekwall K, Svensson JP (2011) Podbat: A novel genomic tool reveals swr1-independent H2AZ incorporation at gene coding sequences through epigenetic meta-analysis. *PLoS Computational Biology* 7: e1002163
- Schvartzman JM, Thompson CB, Finley LWS (2018) Metabolic regulation of chromatin modifications and gene expression. *Journal of Cell Biology* 217: 2247–2259
- Seong KH, Matsumura T, Shimada-Niwa Y, Niwa R, Kang S (2020) The drosophila individual activity monitoring and detection system (DIAMonDS). *ELife* 9: 1–41
- Sharma U, Rando OJ (2017) Metabolic Inputs into the Epigenome. *Cell Metabolism* 25: 544–558
- Shim J, Gururaja-Rao S, Banerjee U (2013) Nutritional regulation of stem and progenitor cells in Drosophila. *Development* 140: 4647–4656
- Shin S C, Kim S H, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, Yoon J-H, Ryu J-H, Lee W-J (2011) Drosophila microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science* 334: 670–674
- Simithy J, Sidoli S, Yuan ZF, Coradin M, Bhanu NV, Marchione DM, Klein BJ, Bazilevsky GA, McCullough CE, Magin RS, et al. (2017) Characterization of histone acylations links chromatin modifications with metabolism. *Nature Communications* 8: 1141
- Skene PJ, Henikoff JG, Henikoff S (2018) Targeted in situ genome-wide profiling with high efficiency for low cell numbers. *Nature Protocols* 13: 1006–1019
- Skene PJ, Henikoff S (2017) An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *ELife* 6: 1–35
- Slack C, Alic N, Foley A, Cabecinha M, Hoddinott MP, Partridge L (2015) The Ras-Erk-ETS-Signaling Pathway Is a Drug Target for Longevity. *Cell* 162: 72–83

- Smolko AE, Shapiro-Kulnane L, Salz HK (2018) The H3K9 methyltransferase SETDB1 maintains female identity in *Drosophila* germ cells. *Nature Communications* 9: 1–11
- Sorge S, Girard V, Lampe L, Tixier V, Weaver A, Higgins T, Higgins T, Gould AP (2025) A *Drosophila* holidic diet optimized for growth and development A *Drosophila* holidic diet optimized for growth and development. *Developmental Cell* S1534-5807(25)00028-0
- Stark R, Brown G (2011) DiffBind: Differential binding analysis of ChIPSeq peak data. Retrieved from <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://biocnductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/DiffBind/inst/doc/DiffBind.pdf&ved=2ahUK-EwjvgsHIs96LAXVWUfUHHdrXMk8QFnoECBMQAQ&usg=AOvVaw1CyZQ7K-8N1I8pVsaNUdOe>
- Stefana MI, Driscoll P C, Obata F, Pengelly AR, Newell CL, MacRae JI, Gould AP (2017) Developmental diet regulates *Drosophila* lifespan via lipid autotoxins. *Nature Communications* 8: 1384
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, et al. (2005) Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 15545–15550
- Suganuma T, Workman JL (2018) Chromatin and Metabolism. *Annual Review of Biochemistry* 87: 27–49
- Sugaya N, Tanaka S, Keyamura K, Noda S, Akanuma G, Hishida T (2023) N-terminal acetyltransferase NatB regulates Rad51-dependent repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Genetic Systems* 98: 61–72
- Tanner KG, Langer MR, Kim Y, Denu J M (2000) Kinetic mechanism of the histone acetyltransferase GCN5 from yeast. *Journal of Biological Chemistry* 275: 22048–22055
- Texada M J, Koyama T, Rewitz K (2020) Regulation of body size and growth control. *Genetics* 216: 269–313
- Thummel CS (1995) From embryogenesis to metamorphosis: The regulation and function of *drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell* 83: 871–877
- Tiwari SK, Toshniwal AG, Mandal S, Mandal L (2020) Fatty acid β -oxidation is required for the differentiation of larval hematopoietic progenitors in *drosophila*. *ELife* 9: 1–35
- Torres-Zelada EF, Weake VM (2021) The Gcn5 complexes in *Drosophila* as a model for metazoa. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1864: 194610

- Trefely S, Huber K, Liu J, Noji M, Stransky S, Singh J, Doan MT, Lovell CD, von Krusenstiern E, Jiang H, et al. (2022) Quantitative subcellular acyl-CoA analysis reveals distinct nuclear metabolism and isoleucine-dependent histone propionylation. *Molecular Cell* 82: 447-462e6
- Trefely S, Lovell CD, Snyder NW, Wellen KE (2020) Compartmentalised acyl-CoA metabolism and roles in chromatin regulation. *Molecular Metabolism* 38: 100941
- Tricoire H, Battisti V, Trannoy S, Lasbleiz C, Pret A M, Monnier V (2009) The steroid hormone receptor EcR finely modulates *Drosophila* lifespan during adulthood in a sex-specific manner. *Mechanisms of Ageing and Development* 130: 547–552
- Truman JW (1990) Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. *Journal of Neurobiology* 21: 1072–1084.
- Tsurumi A, Xue S, Zhang L, Li J, Li WX (2019) Genome-wide Kdm4 histone demethylase transcriptional regulation in *Drosophila*. *Molecular Genetics and Genomics* 294: 1107–1121
- Tsuyama T, Hayashi Y, Komai H, Shimono K, Uemura T (2023) Dynamic de novo adipose tissue development during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 150: dev200815
- Tu M P, Tatar M (2003) Juvenile diet restriction and the aging and reproduction of adult *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 2: 327–333
- Tu WB, Christofk HR, Plath K (2023) Nutrient regulation of development and cell fate decisions. *Development* 150: dev199961
- Uyehara CM, McKay DJ (2019) Direct and widespread role for the nuclear receptor EcR in mediating the response to ecdysone in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 9893–9902
- Van Damme P, Lasa M, Polevoda B, Gazquez C, Elosegui-Artola A, Kim DS, Juan-Pardo ED, Demeyer K, Hole K, Larrea E, et al. (2012) N-terminal acetylome analyses and functional insights of the N-terminal acetyltransferase NatB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 12449–12454
- van der Knaap JA, Verrijzer CP (2016) Undercover: Gene control by metabolites and metabolic enzymes. *Genes and Development* 30: 2345–2369
- Verdin E, Ott M (2015) 50 years of protein acetylation: From gene regulation to epigenetics metabolism and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16: 258–264
- Watanabe K, Furumizo Y, Usui T, Hattori Y, Uemura T (2017) Nutrient-dependent increased dendritic arborization of somatosensory neurons. *Genes to Cells* 22 105–114

- Watanabe K, Kanaoka Y, Mizutani S, Uchiyama H, Yajima S, Watada M, Uemura T, Hattori Y (2019) Interspecies Comparative Analyses Reveal Distinct Carbohydrate-Responsive Systems among *Drosophila* Species. *Cell Reports* 28: 2594-2607e7
- Waterland RA, Jirtle RL (2003) Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology* 23: 5293–5300
- Watson E, Macneil LT, Ritter AD, Yilmaz LS, Rosebrock AP, Caudy AA, Walhout AJM (2014) Erratum: Interspecies systems biology uncovers metabolites affecting *C. elegans* gene expression and life history traits. *Cell* 156: 1336–1337
- Weaver KJ, Holt RA, Henry E, Lyu Y, Pletcher SD (2023) Effects of hunger on neuronal histone modifications slow aging in *Drosophila*. *Science* 380: 625–632
- Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB (2009) ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 324: 1076–1080
- Wilson WA, Wang Z, Roach P J (2002) Systematic identification of the genes affecting glycogen storage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: implication of the vacuole as a determinant of glycogen level. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 1: 232–242
- Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, et al. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901–906
- Wong BW, Wang X, Zecchin A, Thienpont B, Cornelissen I, Kalucka J, García-Caballero M, Missiaen R, Huang H, Brüning U, et al. (2017) The role of fatty acid β -oxidation in lymphangiogenesis. *Nature* 542: 49–54.
- Xu X, Niu C, Liu C, Wang J, Zheng F, Li Q (2021) Screening lager yeast with higher ethyl-acetate production by adaptive laboratory evolution in high concentration of acetic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37: 1–8
- Yamashita K, Oi A, Kosakamoto H, Yamauchi T, Kadoguchi H, Kuraishi T, Miura M, Obata F (2021) Activation of innate immunity during development induces unresolved dysbiotic inflammatory gut and shortens lifespan. *Disease Models and Mechanisms* 14: dmm049103
- Yatabe F, Seike T, Okahashi N, Ishii J, Matsuda F (2023) Improvement of ethanol and 2,3-butanediol production in *Saccharomyces cerevisiae* by ATP wasting. *Microbial Cell Factories* 22: 1–15
- Yin H, Sweeney S, Raha D, Snyder M, Lin H (2011) A High-Resolution Whole-Genome map of key chromatin modifications in the adult *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics* 7: :e1002380

- Yu Y, Huang R, Ye J, Zhang V, Wu C, Cheng G, Jia J, Wang L. (2016) Regulation of starvation-induced hyperactivity by insulin and glucagon signaling in adult *Drosophila*. *Elife* 5: 1–19.
- Zeng X, Han L, Singh SR, Liu H, Neumüller R A, Yan D, Hu Y, Liu Y, Liu W, Lin X, et al. (2015) Genome-wide RNAi Screen Identifies Networks Involved in Intestinal Stem Cell Regulation in *Drosophila*. *Cell Reports* 10: 1226–1238
- Zhang X, Nijland JG, Driessen A JM (2022) Combined roles of exporters in acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 15: 1–13
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, et al. (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology* 9: R137
- Zheng Y, Ahmad K, Henikoff S (2020) CUT & Tag Data Processing and Analysis Tutorial. Retrieved from <https://www.protocols.io/view/cut-amp-tag-data-processing-and-analysis-tutorial-e6nvw93x7gmk/v1>
- 高橋 優喜 (2017) 修士論文
- 水谷 祥子 (2020) 修士論文

注釈

本研究は、複数の共同研究者とともに行われた。特に、研究の進め方や得られた実験結果の解釈については、上村匡教授と議論を重ねた。

本論文の実験データはすべて自らが取得し、解析したが、以下の方々のご助力をいただいた。実験方法を習得する際、古谷寛治博士、牟禮あゆみ博士、渡辺佳織博士からご指南いただいた。実験デザインについては、古谷寛治博士、森明弘博士、長尾耕治郎博士、梅田真郷教授、服部佑佳子博士、上村匡教授と議論し、データ解析については、櫻井望博士、水藤拓人博士、服部佑佳子博士、上村匡教授と議論しながら行った。

謝辞

上村研究室に加わってからの約 8 年間で、上村匡教授と服部佑佳子助教には大変お世話になりました。研究方針や実験データについて日々熱心に議論していただき、建設的なご助言を数多くいただきました。また、研究室外の方々と議論や共同研究を行う機会も多数設けていただきました。研究をここまで進展させられたのは、お二方のご指導とご助力のおかげです。心より御礼申し上げます。

研究室内では、ほかにも多くの方々にお力添えをいただきました。渡辺佳織博士には、ショウジョウバエの取り扱いと、分子生物学実験全般を一から丁寧にご指導いただきました。牟禮あゆみ博士には、本研究の根幹となる yeast-fly 実験方法の基礎を教えてくださいました。高橋優喜氏は yeast-fly 実験系を確立し、46 株の酵母株を分離し、本研究の礎を築いてくださいました。碓井理夫講師には、データの解釈について、貴重なご助言を多数いただきました。二股真由美さんには、寿命アッセイ用のショウジョウバエ実験室餌の調製等の実験補助に、秘書の沖かなえさん、森口良子さん、今井博子さん、二井谷由利子さん、および村木里早さんには事務手続きの補助にご尽力いただきました。日々の研究を滞りなく進めることができたのは、こちらの方々のおかげです。また、ほかの研究室メンバーの方々にも、ミーティングにおいて有意義なご指摘をいただきました。上村研究室のすべての方々に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたっては、研究室外の方々にも大変お世話になりました。特に、以下に挙げる共著者の皆様には多大なお力添えをいただきました。水藤拓人博士には、脂肪酸添加実験に関して数々の助言をいただきました。工学研究科の梅田眞郷名誉教授、アバディーン大学の森明弘博士、京都薬科大学の長尾耕治郎准教授は、高橋優喜氏と水藤拓人博士とともに、酵母実験やその解析に大変ご助力いただきました。公益財団法人かずさ DNA 研究所の櫻井望チーム長には、メタボローム解析方法を丁寧にご指導いただきました。

他にも、以下の方々から大きなお力添えをいただきました。理化学研究所の近藤武史チームリーダー（元、当研究室の特定講師）、当研究科の吉竹良洋助教、山銅ゆかりさんには、RNA-seq 解析や CUT&RUN 解析において、ライブラリ調製とシーケンスを実施していただきました。加えて、河内孝之教授と吉竹良洋助教に

は、CUT&RUN 実験時に使用する酵素を分与いただきました。当研究科の古谷寛治講師には、酵母実験の手法の指南と助言、また実験器具をお貸しいただいたり、さらに、CUT&RUN 実験の予備実験となるウェスタンブロッティングを複数回行っていただいたりと、手厚いご支援を頂戴しました。理化学研究所の小幡史明教授には、本研究で使用したショウジョウバエ系統を分与いただいた他、GeneSwitch 実験方法の詳細のご教示や、データへの有意義な助言と、あらゆる面で多大なご尽力を賜りました。農学研究科の丸山世倫氏と松宮健太郎准教授には、乳化剤添加について有意義な助言を頂き、当研究科の神戸大朋准教授には松宮健太郎准教授をご紹介いただきました。御三方のおかげで添加実験の活路を見出すことができました。神奈川県立保健福祉大学の成耆鉉教授と山形大学の姜時友助教には、当研究室への人工気象器の導入の際、ご助力いただきました。大阪大学の松田史生教授には、酵母の短鎖脂肪酸測定について、複数の有用な文献を紹介いただきました。

また、東京都立大学の相垣敏郎特任助教、新潟大学の佐藤由紀子博士、金沢大学の倉石貴透教授、大阪大学の立花誠教授、iPS 細胞研究所の山本拓也教授、東京薬科大学の伊藤昭博教授、理化学研究所環境資源科学研究センターの八代田陽子副チームリーダー、理化学研究所の眞貝洋一主任研究員、東京大学の白髭克彦教授、理化学研究所の平谷伊智朗チームリーダー、MRC 分子生物学研究所の平林享グループ長、筑波大学の丹羽隆介教授、理化学研究所の梅原崇史上級研究員、モナシユ大学の Matthew D. Piper 准教授、当研究科の田中紀子特定准教授、カロリンスカ研究所の Karl Ekwall 教授にもそれぞれのご専門の観点からご指摘やご助言をいただきました。当研究科の James Hejna 教授には根拠論文の英文校正をしていただき、内容についても的確なご指摘を多数いただきました。ヒト生物学高等研究拠点の Spyros Goulas 講師にも英文校正と助言をいただきました。また、令和 3 年 4 月から令和 5 年 3 月までは日本学術振興会の特別研究員 DC2 として研究に従事させていただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、これまで私の研究生活を見守り、支え励ましてくださった家族や友人にも厚くお礼申し上げます。

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す。

Shoko Mizutani, Kanji Furuya, Ayumi Mure, Yuuki Takahashi, Akihiro Mori, Nozomu Sakurai, Takuto Suito, Kohjiro Nagao, Masato Umeda, Kaori Watanabe, Yukako Hattori, Tadashi Uemura

Growth phase diets diminish histone acetyltransferase Gcn5 function and shorten lifespan of *Drosophila* males.

EMBO Reports, 26, 3856–3888, 2025. doi.org/10.1038/s44319-025-00503-8

水谷 祥子