

---

## 研究報文

---

### 飢餓が雄性体線虫の生殖能力に及ぼす影響

福田 仁美, 小池 なつみ, 松本 晋也

Effects of Starvation on Fecundity of *Caenorhabditis Elegans* Male

Hitomi Fukuda, Natsumi Koike and Shinya Matsumoto

#### Summary

Epigenetics has recently emerged as the third contributor, the genetic and environmental factors as the first two, for development of diseases such as obesity, cardiovascular disease, stroke and diabetes in adult stage. The epigenetic modifications have been identified to be introduced into the genome during fertilization, embryogenesis and fetus development, and the quantity and quality of the modifications is known to be subjected to environmental conditions including nutrition. Thus, FOAD (Fetal Origin of Adult Diseases) theory, the molecular mechanism of which is mainly based on the epigenetic modifications, has become an attracting theory for prevention of the life-style related disease. There are not enough data, however, if the environmental conditions may affect differently between the sex of parent generation, or that of the progeny generation. To gain information, starvation was introduced to *Caenorhabditis elegans* male, and its effect on the fecundity was analyzed. We also analyzed if there exists difference between sex of the progeny worms, and showed that lifespan tended to extend in male progeny compared to hermaphrodite. The results indicate that different epigenetic modifications are introduced in the progeny generations leading to the possible establishment of sexual difference in the sensitivity toward the environmental factor. (Received November 13, 2014)

#### I. 緒 言

生物の成長, 生殖, 代謝などは環境的要因と遺伝的要因の二つで規定されると考えられてきたが, 近年エピジェネティクス変異が第三の要因として大きく関与している可能性が指摘されている。エピジェネティクス変異とは, 遺伝子の塩基配列は変化しないが, ヌクレオチドのメチル化, ヒストンタンパク質の化学修飾, miRNA (microRNA) による翻訳制御などにより, 生涯にわたり遺伝子発現パターンが変化する現象である<sup>1)</sup>。エピジェネティクス変異は配偶子形成, 受精, 胚発生, 胎児形成, 出生後授乳期の各ステージでさまざまな環境因子によりもたらされることが分かってきた。特に胚発生から胎児期における栄養状態の過不足は, 生涯に及ぶ遺伝子発現パターンの変化を引き起こすことを示すデータが

蓄積している。胎児における遺伝子発現パターンの恒久的な変化は, その個体の環境への適応性や感受性, 代謝機能に大きく影響を及ぼすことから, 成人期に発症する疾病の原因は胎児期に形成されるとする「成人病胎児期起源説 (Fetal Origin of Adult Diseases Theory: FOAD)」が認知されつつある<sup>2-4)</sup>。近年 FOAD 説はさらに拡張され, 肥満や糖尿病, がんといった生活習慣病に加え, 精神・心理状態や普段の健康状態までもが受精から胎児, 乳幼児期に規定される (あるいは, 大きく影響をうける) とする Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)<sup>5)</sup> が提唱されている。FOAD 説, あるいは DOHaD 説の分子メカニズムは解明されたわけではないが, 上述したエピジェネティクス変異はこれらの仮説を説明しうる有力な細胞生物学的, 分子生物学的現象である。

エピジェネティクス変異をもたらすいくつかの要因が報告されているが, なかでも特定の栄養素の過

不足(一炭素代謝に関わる葉酸やメチオニン<sup>6)</sup>、あるいは全般的な栄養不足による影響<sup>7)</sup>は比較的によく研究されている。特に、最も激しい栄養不足状態を表す飢餓については、飢餓を経験した妊婦から生まれた子供が成人後生活習慣病罹患率が高かったことが見いだされたオランダ飢餓事件<sup>8)</sup>や、出生体重と冠動脈疾患による死亡率との間に相関が認められた疫学データ<sup>7)</sup>などから、エピジェネティクス変異との関連性が指摘されている。これらの知見は妊娠中の女性が過度に栄養過多であったり、または過度に栄養不足に陥った場合、胎児にエピジェネティクス変異が生じてしまう可能性があることを示唆している。このことは、日本において特に重大な意義を持つと思われる。というのも、日本では「胎児の飢餓」ともいえる低出生体重児(出生体重が2,500 g未満の新生児)が一貫して増え続けており、2012年には全体の9.57%を占めるに至っているからである<sup>9)</sup>。FOAD説に従えば、これら低出生体重児は生活習慣病に罹患しやすい体質で生まれている可能性があり、もしそうならば将来の日本人の健康、日本社会の公衆衛生・保健・医療に大きな影響を及ぼす恐れがある。したがって、FAOD説が本当に成立するのか、もし成立するならばどの栄養素が、どのようなタイミングで、どのようなメカニズムで影響を發揮するのかを研究することは重要である。

FOAD説を研究するうえでのポイントの一つは、「性別」という視点である。これには二つがある。一つ目は、親世代の性別による違いがあるのかという点である。これまでは雌性体の親世代(メス親)の栄養状態と次世代との関係性が主に研究されてきたが、雄性体の親世代(オス親)の栄養状態が次世代に影響を及ぼすかという研究はほとんどない。オス親の栄養状態が何らかの形で精子に作用し、受精を介して次世代の体質に影響を与えるという仮説を支持する疫学的知見は存在するものの<sup>10,11)</sup>、その存在を明確に示すデータが存在しない。二つ目の視点は、親世代が経験した栄養状態が次世代に及ぶとき、生じた次世代の性別による違いが生じるのかという点である。つまり、生じた子供の性別が雄性体の場合と雌性体の場合とでは現れる影響が異なるのかという点である。

自活性土壌線虫である *Caenorhabditis elegans* は、体長約1ミリ程度の線形動物である<sup>12,13)</sup>。48~60時間で成虫になり、その後2~3日間の繁殖期間を含め2~3週間の寿命を持つ。神経系・消化器系・上皮系・筋肉系といった動物としての基本的な構成を

持つこと、全ゲノム配列と全シナプス構造が解明されていること、雌雄同体を基本として自家受精で繁殖すること、さまざまな遺伝子操作技術が確立していることから、多細胞動物特有の生命現象を解析するモデル生物として広く用いられている<sup>14)</sup>。実際、線虫で見いだされたアポトーシス、RNA干渉(RNAi)、miRNAといった現象は植物やほ乳類でも見いだされており、線虫はモデル生物としての実績を十分確立している。また、解糖系から電子伝達系に至るエネルギー代謝経路、脂肪酸やアミノ酸の異化・同化経路に関わる遺伝子の多くが線虫には保存されていることから、摂食行動、寿命、エネルギー代謝、環境適応などといった分野でも活用されつつある<sup>15-17)</sup>。

線虫には、雌雄同体と雄性体の2つの性がある。雌雄同体線虫は体内で精子と卵子の両方をつくり、自家受精により仔線虫(自家受精仔線虫)を生じる。それに対して、雄性体線虫は精子のみをつくり、雌雄同体線虫との交配により仔線虫(交配仔線虫)を生じる。雄性体線虫は1,000匹に1匹程度の頻度でしか生じないので、線虫は通常は自家受精で繁殖するが、交配による繁殖は環境の変化を生き抜くためのゲノムの再構成に有用であると考えられている<sup>12,13)</sup>。

本研究では、このような線虫の生殖特性を利用し、飢餓を体験した雄性体線虫から生じた仔線虫に違いがあるのかを解析し、雄性体においてもFOAD説が成立するのかを検討した。さらに、飢餓を体験した雌雄同体線虫から生じた雄性体線虫と雌雄同体線虫との寿命を解析することで、性別によって次世代への影響が異なるのかを検討した。その結果、飢餓を経験した親線虫から生じた雄性体仔線虫と経験していない線虫から生じた雄性体仔線虫とでは寿命に差が生じている可能性が示された。このことは親世代における栄養状態の次世代への影響は性別によって異なる可能性を示唆している。

## II. 実験方法

### 1) 試 薬

試薬は生化学的グレード、特級をナカライテスク(日本)と和光純薬(日本)から購入した。

### 2) 線虫と飼育方法

野生型線虫株 Bristol N2, *dpy-11* (e224:CB224)、大腸菌 OP50 は CGC (*Caenorhabditis elegans* Genetic Center) から分与された。線虫は OP50 を餌として、

NGM (Nematode Growth Medium) プレート上で維持した。線虫の扱い、試薬の作製は常法に従った<sup>12,13)</sup>。線虫は20℃で維持した。

通常雄性体線虫は0.1%程度しか生じないが、熱ショックをかけると染色体不分離の頻度が上昇するため雄性体の出現確率が上昇する。それを利用して雄性体線虫を取得し、維持した<sup>13)</sup>。具体的には、卵をもつ若い雌雄同体線虫を30℃で2、4、6、8時間の熱ショック後、20℃で産卵させ、生じた仔線虫集団から雄性体線虫を選抜した。雄性体線虫10匹：雌雄同体線虫3匹の割合で飼育し、雄性体線虫を維持した。

### 3) 同調培養

生育ステージを揃えた線虫集団を取得するため、次亜塩素酸を使って同調培養をおこなった。具体的には、卵をもつ若い雌雄同体線虫をS-Basal (0.1 M NaCl, 50 mM NaPi pH 6.0) で洗浄したのち、10倍希釈した漂白剤 (花王キッチンハイター (界面活性剤不含) : 次亜塩素酸濃度約10%) で処理した。次亜塩素酸により線虫体が崩壊するのを確認した後、遠心分離 (1500×g, 20℃, 5分間) で卵を集めたのちNGMプレートに移した。孵化した線虫はほぼ同一の生育ステージの集団であり、以降の実験にはこの集団を用いた。

### 4) 飢餓プロトコール

飢餓が雄性体線虫の生殖能力に及ぼす影響を検討するため、以下の手順で実験をおこなった。成長したN2雄性体線虫約200匹をS-Basalで2 mlサンプルチューブに移して遠心したのち、上澄を除いた。(12000×g, 室温, 1分間)。この洗浄操作を2回おこなった後、雄性体線虫を2群に分けた。1群はOP50を播いたNGMプレートに移して餌を与え (給餌群)、もう一方は大腸菌を播いていないNGMプレートに移して絶食させた (絶食群)。48時間後、両群から10匹の雄性体線虫を回収し、3匹の若い*dpy-11*雌雄同体線虫とともに餌ありNGMプレートで24時間交配させた。この交配プレートを絶食群と給餌群で5枚ずつ調製し、これらを交配1日目プレートとした。翌日交配1日目プレートから雄性体線虫だけを回収し、別の新たな*dpy-11*雌雄同体線虫とともに新鮮なNGMプレートでさらに24時間交配させ、これを交配2日目プレートとした。この操作を継続し交配5日目プレートまで作成した。これらを交配プレートを3日間培養し、生じた次世代線虫集

団中の野生型雄性体線虫、野生型雌雄同体線虫 (雄性体線虫と*dpy-11*雌雄同体線虫との交配仔線虫)、*Dpy*線虫 (*dpy-11*雌雄同体線虫の自家受精仔線虫) の数をカウントし、統計解析した。

飢餓を経験した親線虫から生じた次世代線虫の性別による寿命の違いを検討するため、同調培養した若い*dpy-11*雌雄同体線虫をS-Basalで2 mlサンプルチューブに移して遠心した (12000×g, 室温, 1分間)。この洗浄操作を2回おこなった後、*Dpy*線虫を2群に分け、1群はOP50を播いたNGMプレートに移して餌を与え (給餌群)、もう一方は大腸菌を播いていないNGMプレートに移して絶食させた (絶食群)。両群の*dpy-11*雌雄同体線虫をOP50を播いたNGMプレートに回収した後、N2雄性体線虫3匹に対して雄性体線虫10匹の割合で一晩交配させた。翌日*Dpy*線虫 (交配仔線虫を体内に持っている) を次亜塩素酸で処理し、生育ステージが揃った交配仔線虫集団を得る。2日後、交配仔線虫から雄性体線虫および雌雄同体を96穴プレートに1匹/穴で移した。各穴は次の組成の大腸菌懸濁液を入れておいた (OD = 0.2 相当のOP50, 360 μM 5'-fluorouridine deoxyribonucleic acid, 100 mg/ml Ampicillin, 5 μg/ml cholesterol in S-basal)。この液体培地にて線虫を維持し、寿命を測定した。

### 5) 寿命解析と統計処理

寿命曲線作成および寿命曲線の有意差検定は、それぞれRを用いたKaplan-Meier法とLog-Rank法でおこなった。 $\chi^2$ 検定はマイクロソフトエクセル2011でおこなった。

## III. 結果と考察

### 飢餓を経験した雄性体線虫の生殖能力

雄性体の生殖能力に飢餓がどのような影響を与えるかはほとんど研究されていない。そのモデルとして、雄性体線虫に飢餓を経験させ、その子孫線虫の数、性別を解析することで雄性体線虫精子に対する飢餓の影響を検討した。具体的には、野生型N2雄性体線虫に24時間の飢餓を経験させた後*dpy-11*雌雄同体変異体を交配させ、その後*dpy-11*雌雄同体線虫が生む仔線虫の体型、性別を5日間にわたって計数した。*dpy-11*遺伝子は細胞膜結合型チオレドキン様タンパク質をコードする遺伝子であり、その変異遺伝子*dpy-11* (*e224*) をもつ変異体線虫 (CB224) はずんぐりした体型を示すので、ほっそりした野生型線虫とは目視により簡単に区別できる。*dpy-11*

(*e224*) 変異は劣性変異なので、*dpy-11* 雌雄同体変異線虫と野生型N2雄性体線虫から生じた交配仔線虫は、ほっそりした野生型体型を示すのに対して、*dpy-11* 雌雄同体線虫の自家受精仔線虫はずんぐりした体型を示す。この体型の違いから、交配仔線虫と自家受精仔線虫を区別することができ、それを利用して雄性体線虫の精子の質、ひいては生殖能力の違いを定量的に評価することが可能となる。

まず、飢餓を経験した雄性体線虫と経験していない雄性体線虫の全般的な生殖能力を把握するために、両者の交配仔線虫の数を解析した（図1）。絶食後4日間にわたって雄性体線虫1匹から平均10～45匹の仔線虫が生じていた。2日目を除き、絶食群由来の仔線虫数が、給餌群由来より少ない傾向があるが、統計解析の結果有意な差は認められなかった。したがって、絶食を経験しても全体的な生殖能力には大きな影響は生じないことが示された。生殖能力を決める要因に精子の質、たとえば運動能力、生存率、精子産生効率と産生数が挙げられる。飢餓のような極端に栄養状態が悪化した状況で、これらの要因がどのような影響を受けるのかは明らかではない。今回の結果は、絶食を経験しても雄性体線虫がつくる精子の質には大きな影響が及ばないことが示された。

線虫は5対の常染色体（染色体I～V; A）、1対の

性染色体（X染色体）からなり、雌雄同体線虫と雄性体線虫の染色体構成は2AXX、2AXΦと表すことができる（Φは染色体が存在しないことを示す）。したがって、雄性体線虫からはAXとAΦという染色体構成をもつ2種類の精子が作られ、その結果交配仔線虫における雄性体線虫と雌雄同体線虫の比、つまり性別比は理論的には1：1となる。飢餓が精子形成時の染色体構成に影響を与えるという報告は見いだせない。しかし、先に述べたエビジェネティクスの知見を考慮するならば、飢餓が染色体構成に何らかの影響を及ぼし、その結果交配仔線虫の性別比に変化をもたらすことはあり得るかもしれない。そこで、絶食を経験した雄性体線虫、絶食を経験していない雄性体線虫から生じた交配仔線虫における性別を解析した（図2）。絶食後1日目は絶食群、給餌群ともに理論値である50%にほぼ近い値を示しているが、2日目以降は50%からの逸脱が顕著となる。実際 $\chi^2$ 検定をおこなうと給餌群、絶食群のp値はそれぞれ $1.48 \times 10^{-32}$ 、 $2.09 \times 10^{-29}$ となり、交配仔線虫の性別比率は有意に50%から逸脱していることがわかった。しかし、この逸脱は飢餓を経験していない給餌群においても顕著である。また、逸脱のパターンも一貫していない。たとえば、給餌群では3、4日目は雄性体が少ないが、絶食群では反対に雄性体が多い傾向を示している。このことか

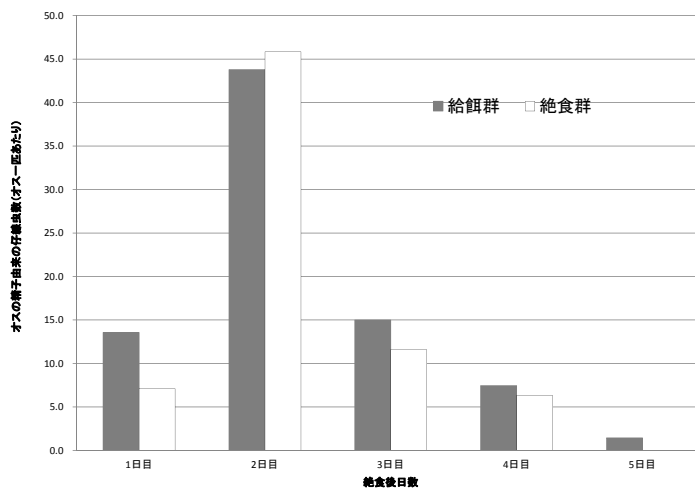


図1. 絶食が雄性体線虫の生殖能力に及ぼす影響

24時間飢餓を経験した雄性体線虫（絶食群）に由来する仔線虫と飢餓を経験していない雄性体線虫（給餌群）に由来する仔線虫数の経時的な変化

縦軸は、それぞれのプレートにおける仔線虫数の平均値。実験中に雄性体線虫が死んでしまう場合があるので、雄性体線虫1匹あたりの仔線虫の数で評価した。横軸は絶食後の経過日数。4回行った実験の代表的な一例を示した。

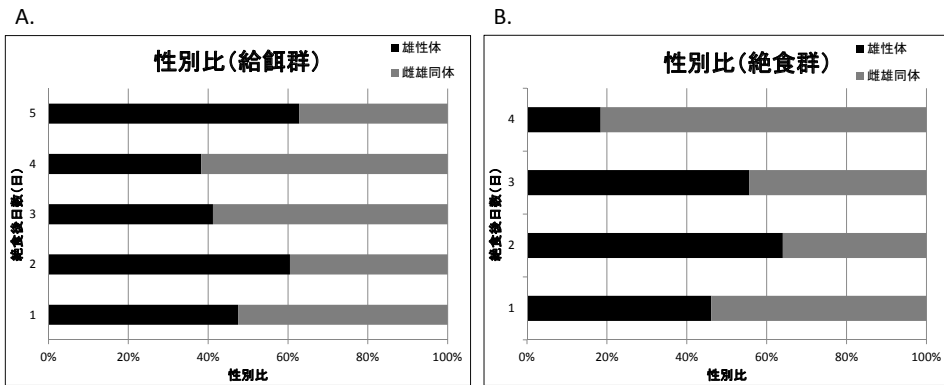


図 2. 絶食が次世代の性別に及ぼす影響

24時間飢餓を経験した雄性体線虫(絶食群)に由来する仔線虫と飢餓を経験していない雄性体線虫(給餌群)に由来する仔線虫の性別比の経時的変化

縦軸は、全プレートにおける雄性体線虫と雌雄同体線虫の比。横軸は絶食後の経過日数。Aが給餌群、Bが絶食群の比を表している。4回行った実験の代表的な一例を示した。各群および各日数における比が理論値である0.5から有意に逸脱しているかを $\chi^2$ 乗検定にて検定した。絶食群と給餌群全体における $p$ 値はそれぞれ $1.48 \times 10^{-32}$ 、 $2.09 \times 10^{-29}$ 。

ら、交配仔線虫の性別比にはばらつきは認められるものの、雄性体線虫が飢餓を経験したこととの関連性は認められないと考えられる。

#### 飢餓を経験した親線虫から生じた次世代線虫の性別による寿命の違い

親世代が飢餓を経験すると次世代に影響が生じることはこれまでの研究から示されているが、次世代個体の性別による影響の違いが存在するのかわくはよくわかっていない。そこで、*dpy-11*雌雄同体線虫に24時間の絶食を施したあと、N2雄性体線虫と交配させた。生じた交配仔線虫を雄性体、雌雄同体に分別して、OP50を含む液体培地で飼育して寿命を測定、解析した。一般に寿命解析はOP50を播種したNGMプレートでおこなうが、雌雄同体線虫が存在しない固形プレートで雄性体線虫を飼育し続けると交配相手である雌雄同体線虫を捜し求めてプレート壁に上ってしまい、死んでしまうということがたびたび起きる。これを避けるため、今回の実験では固形培地であるNGMプレートではなく、液体培地を使うこととした。

雄性体線虫では、14日目辺りまでは給餌群と絶食群には寿命の違いは認められない。しかし、その後、絶食群の寿命は給餌群に比べ伸びる傾向が認められた(図3)。平均寿命(中央値平均)は絶食群が19日であるのに対して給餌群は17日であり、約11.7%延長した。また、Log-Rank法による有意差検

定においても $p = 0.01687$ を示しており、有意水準5%で有意に寿命が延びているといえる。ただ、平均寿命の延びが観察される一方、最長寿命には大きな差は認められなかった。一方、雌雄同体線虫では絶食群と給餌群との間に明確な差は認められなかった(図4)。中央値平均寿命はともに17日であり、Log-Rank法による有意差検定においても有意差は認められなかった。

図3、4の結果は、親線虫が飢餓を体験すると雄性体仔線虫の寿命は延びるが、雌雄同体仔線虫の寿命は延びないことを示唆している。つまり、親の飢餓経験が次世代に影響を及ぼす際、性別による違いが生じる可能性を示している。現在のところ、このような性別による影響の違いを説明する分子メカニズムは知られていない。また、性別によって影響が異なることを示すデータ、知見も少ない。したがって、今回線虫で認められた結果は再現性を含め多面的に検討を加える必要がある。一つは寿命遺伝子の発現パターンを解析することである。親線虫が飢餓を経験することで雄性体仔線虫の寿命が延長したならば、それら仔線虫では寿命を抑制している寿命遺伝子*daf-2*、*age-1*の発現が低下している可能性がある<sup>18,19)</sup>。さらに、今回は*dpy-11*という寿命制御に関わらない変異体を用いて実験を行ったが、寿命遺伝子変異体の雄性体を用いて実験をおこなえば親世代の飢餓の影響が消える、または修飾されるという現象が見い出せるかもしれない。そういう結

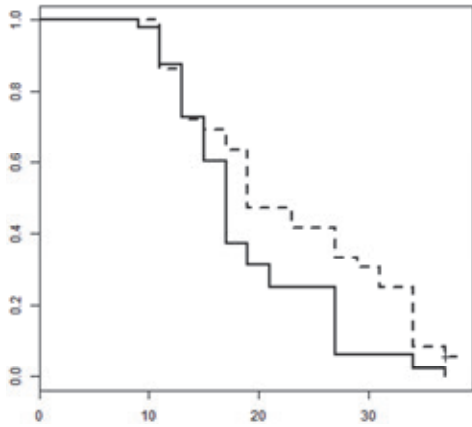


図3. 絶食を経験した親世代から生じた次世代線虫の寿命 (雄性体線虫)

飢餓を経験した親線虫から生じた雄性体仔線虫の寿命曲線 (Kaplan-Meie法)。飢餓を経験した dpy-11 雌雄同体線虫と N2 雄性体線虫から生じた雄性体仔線虫 (絶食群), 飢餓を経験していない dpy-11 雌雄同体線虫と N2 雄性体線虫から生じた雄性体仔線虫 (給餌群) の寿命極性はそれぞれ破線, 実線で表されている。縦軸は生存率, 横軸は成長してからの生存日数 (adult lifespan)。両寿命曲線の Log-Rank 検定による  $p$  値は 0.0168。n = 36

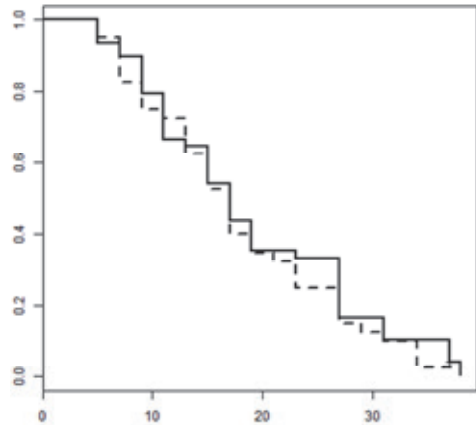


図4. 絶食を経験した親世代から生じた次世代線虫の寿命 (雌雄同体線虫)

飢餓を経験した親線虫から生じた雌雄同体仔線虫の寿命曲線 (Kaplan-Meie法)。飢餓を経験した dpy-11 雌雄同体線虫と N2 雄性体線虫から生じた雄性体仔線虫 (絶食群), 飢餓を経験していない dpy-11 雌雄同体線虫と N2 雄性体線虫から生じた雄性体仔線虫 (給餌群) の寿命極性はそれぞれ破線, 実線で表されている。縦軸は生存率, 横軸は成長してからの生存日数 (adult lifespan)。両寿命曲線の Log-Rank 検定による  $p$  値は 0.435。n = 40

果が得られれば, 親線虫の飢餓体験が次世代の雄性体線虫の寿命を延ばすという現象を支持するデータになりうると考えられる。

本研究は, 親世代の栄養状態が次世代の健康状態に大きく影響する可能性があるという FOAD 説の仮説をもとに, まだ明らかになっていない“性別間での影響の違い”について着目し, 線虫をモデル生物として研究を展開した。その結果, 雄性体線虫の飢餓体験が次世代に影響を及ぼす証拠は得られなかったものの, 親世代の飢餓体験が次世代に影響を及ぼす際, 性別による違いが存在することを示唆するデータは得られた。この知見はこれまで受精期, 胚発生期, 胎児形成期など母胎をベースに考えられてきた FOAD 説の研究に新しい視点を投げるとともに, 父親の影響状態の重要性を見直すきっかけになりうると考えられる。エピジェネティクスにおける「性別」という視点はまだ未開拓な分野なので, 今後は本実験結果の再現性をしっかり取るとともにこの現象を多面的, 多角的に検討, 検証する必要がある。

#### IV. 引用文献

1) Human transgenerational responses to early-life

experience: potential impact on development, health and biochemical research. M Pembrey, R Saffery, LO Bygren, *J Med Genet* 51, pp. 563-572 (2014)

2) Infant mortality, children nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. DJ Barker, C Osmond, *Lancet* 1 (8489), pp. 1077-1081 (1986)

3) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. DJ Barker, PD Winter, C Osmond, B Margetts, SJ Simmonds, *Lancet* 2 (8663), pp. 577-580 (1989)

4) Fetal nutrition and cardiovascular disease. DJ Barker, PD Gluckman, KM Godfrey, JE Harding, JA Owens, JS Robinson, *Lancet* 341 (8850), pp. 938-941 (1993)

5) Developmental Origins of Health and Diseases: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. PD Wadhwa, C Buss, S Entinger, JM Swanson, *Semin Perinatal Med* 27 (5), pp. 358-368 (2009)

6) DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. KD Sinclair, C Allegrucci, R Singh, DS Gardner, S

- Sebastian, J Bispham, A Thurston, JF Huntley, WD Rees, CA Maloney, RG Lea, J Craigon, TG McEvory, LE Young, PNAS 104, pp. 19351–19356 (2007)
- 7) Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modifications of hepatic gene expression in the offspring. KA Lillycrop, ES Phillips, AA Jackson, MA Hanson, GC Burdge, J Nutr 135, pp. 1382–1386 (2005)
  - 8) Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. TJ Roseboom, JH van der Meulen, AC Ravelli, C Osmond, DJ Barker, Mol Cell Endocrinol 185, pp. 93–98 (2001)
  - 9) 人口動態2013 (厚生労働省) <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei13/index.html>
  - 10) Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. C Gallou-Kabani, A Gabory, J Tost, PLoS ONE 5, e14398 (2010)
  - 11) Gestational low protein diet in the rat mediates Igf2 gene expression in male offspring via altered hepatic DNA methylation. L Gong, YX Pan, H Chen, Epigenetics 5, pp. 619–626 (2010)
  - 12) The nematode *Caenorhabditis elegans*. WB Wood (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)
  - 13) The *C.elegans* II. DL Riddle (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997)
  - 14) ネオ生物学シリーズ5 線虫－1000細胞のシンフォニー. 小原雄治 (編), 共立出版 (1997)
  - 15) Reproduction and Longevity: Secrets revealed by *C. elegans*. A Mukhopadhyay, HA Tissenbaum. Trends in Cell Biology 17(2), pp. 65–71 (2006)
  - 16) Model Organisms as a Guide to Mammalian Aging. HA Tissenbaum, L Gaudente. Dev Cell 1, pp. 9–19 (2002)
  - 17) Public and private mechanisms of life extension in *Caenorhabditis elegans*. K Houthoofd, JR Vanfleteren, Genomics, 277 pp. 601–617 (2007)
  - 18) Research of Aging: The end of the beginning. GM Martin, K LaMarco, E Strauss, KL Kelner, Science 299, pp. 1339–1359 (2003).
  - 19) Extension of life span in *Caenorhabditis elegans* by diet lacking Coenzyme Q. P Larsen, CF Clarke, Science, 295 pp. 120–123 (2002)