

東京大学大学院新領域創成科学研究科

環境学研究系自然環境学専攻

自然環境循環学講座

令和3年度 修士論文

オオミジンコ 3 系統の網羅的遺伝子発現の系統差に基づく DNA メチル化の
評価および環境汚染化学物質への感受性比較

Evaluation of the DNA methylation and sensitivity comparison of
environmental contaminants based on different gene expression profiles of
three *Daphnia magna* strains

2022 年 1 月 20 日提出

2021 年度 3 月修了

指導教員 山本裕史 教授

47-206606 加藤晃汰

目次

第 1 章 緒論

- 1.1 背景
- 1.2 目的

第 2 章 研究領域の先行研究

- 2.1 オオミジンコ系統間における化学物質の感受性の違いに関するこれまでの報告
- 2.2 *Daphnia* 属の系統間における遺伝的な相違:特に DNA メチル化に関する報告
- 2.3 網羅的な遺伝子発現解析を用いた *Daphnia* 属系統間化学物質感受性差の原因解明に関する報告

第 3 章 オオミジンコ 3 系統の遺伝子発現の比較と DNA メチル化の評価

- 3.1 研究目的と概要
- 3.2 実験方法
 - 3.2.1 対象生物の情報と飼育条件
 - 3.2.2 基礎データの取得方法
 - 3.2.3 Cytochrome oxidase I (COI) 配列情報の取得方法
 - 3.2.4 RNA-sequencing の実験操作
 - 3.2.5 遺伝子発現変動解析 (Differentially Expressed Genes: DEGs)
 - 3.2.6 対象遺伝子の DNA 配列中の CpG 領域の有無を確認
 - 3.2.7 オオミジンコへの DNA メチル化阻害剤の影響
 - 3.2.8 リアルタイム PCR (定量 PCR)
- 3.3 結果と考察
 - 3.3.1 オオミジンコ 3 系統の基礎情報の取得:形態的特徴(見た目や体長, 乾燥重量, 脱皮数)とミトコンドリア DNA 配列情報
 - 3.3.2 RNA-sequencing による各系統の遺伝子発現情報の違い
 - 3.3.3 DNA メチル化解析の対象とする遺伝子の選定(発現量の系統間比較と CpG 領域の検索)
 - 3.3.4 DNA メチル化阻害剤のオオミジンコへの毒性影響の確認
 - 3.3.5 DNA メチル化阻害剤による遺伝子発現量の変化の確認
 - 3.3.6 オオミジンコ 2 週齢を用いた定量 PCR におけるサンプル間の遺伝子発現量の精度の改善
- 3.4 第 3 章のまとめ

第 4 章 網羅的な遺伝子発現解析に基づくオオミジンコ系統間の環境汚染化学物質に対する感受性の比較

- 4.1 研究目的と概要
- 4.2 実験方法
 - 4.2.1 Gene Ontology enrichment 解析
 - 4.2.2 リアルタイム PCR (定量 PCR)
 - 4.2.3 キチン含有量の測定
 - 4.2.4 キチナーゼ活性の測定
 - 4.2.5 急性遊泳阻害試験
 - 4.2.6 統計解析
- 4.3 結果と考察

- 4.3.1 系統特異的な発現変動遺伝子の機能解析 (Gene Ontology enrichment)
- 4.3.2 定量 PCR による RNA-sequencing 結果の検証
- 4.3.3 キチン代謝に関わる機能の測定
- 4.3.4 急性遊泳阻害試験による系統間の感受性比較

第 5 章 結論

- 5.1 本研究のまとめ
- 5.2 本研究成果の自然環境循環学分野への貢献と自然環境学における意義

引用文献

謝辞

Appendix

付録

第 1 章. 緒論

1.1 背景

各国の化学物質管理の制度において、化学物質の生態系への影響を評価するため生態毒性試験が導入されている。試験生物種は、生態系の生産者(藻類等)、一次消費者(甲殻類等)、二次消費者(魚類等)の 3 生物群が利用されることが多い。それぞれの試験法には、国際的に合意された OECD のテストガイドラインが用いられ、試験基準を満たす試験データは、化学物質の安全性データの相互受理の制度により各国で相互利用できる(OECD, 1981)。試験法のうち甲殻類には、淡水生態系の一次消費者としてミジンコ属の *Daphnia magna* (オオミジンコ) をモデル生物としたテストガイドライン No. 202 (TG202, OECD, 2004) の試験が頻繁に使用される。

オオミジンコは短日周期や水温の低下等の環境要因の変化によりオスの仔虫を産仔することがあるが、試験機関等における通常飼育条件などの安定した環境条件下では、メスの単為生殖によるクローンで増殖するのが一般的である。現在までにアメリカやヨーロッパ、アジアで試験に使用されているオオミジンコには、野外からの採取起源等の違いにより、発生的に異なる様々な系統の存在が明らかにされている (Fields et al., 2015; Bekker et al., 2018)。第 2 章で詳しく紹介するが、オオミジンコの各系統は発生的な違いにとどまらず、様々な試験エンドポイントを用いた際の化学物質に対する影響の強さ(感受性)に違いが報告されている。それにも関わらず、試験法では系統の指定はされていなく、試験に用いる系統によっては、同じ物質でも生態毒性評価が異なる可能性があることが懸念される。

オオミジンコ系統間における感受性の差に関する報告例では、系統ごとに継代・飼育条件を揃えている場合にも、最大で 100 倍程度の差が報告されている。そのため、異なる系統の試験結果に差を引き起こしている原因には、一般に指摘されている飼育条件や試験操作等の人為的な操作により引き起こされる外的な要因のみならず、生物学的な要因の 1 つとして指摘されている遺伝的な相違が挙げられる可能性も十分に高いと考えられる (Persoone et al., 2009)。

甲殻類や藻類、魚類などの同種個体間における化学物質感受性に差を引き起こす遺伝的な相違には、化学物質への応答遺伝子群の発現量の変化が挙げられる (Latta et al., 2012; Lyu et al., 2019)。また、遺伝子発現量を制御する機構として、塩基配列の変異や欠損、重複等のゲノム変異 (Weston et al., 2013; Major et al., 2020; Medina et al., 2007; Whitehead et al., 2017; Yamagishi et al., 2020) や塩基配列への化学的修飾により遺伝子発現を制御する DNA メチル化やヒストン修飾等のエピジェネティック制御 (Vandegheuchte and Janssen, 2014) の個体間における差も感受性に関連する機構として示唆されている。

前述したように、ゲノム変異やエピジェネティック制御は、いずれも化学物質の感受性に直接影響するのではなく、その結果が遺伝子発現量の変化として現れることにより感受性に影響を及ぼす。そのため、化学物質に対する感受性のメカニズムをより直接的に解明できるツールとして、網羅的な遺伝子発現解析手法である RNA-sequencing (RNA-seq) やマイクロアレイが一般的に使用されている。*Daphnia* 属の系統間を対象に遺伝子発現解析手法を適用したこれまでの先行研究では(詳細は第 2 章に後述)、あらかじめ特定物質に対する感受性に差があることが判明している複数系統を対象に、感受性差の原因候補として、特定遺伝子群の発現量の差が生じていることを明らかにしている。これらの既存文献で示唆されているように、特定物質に対する感受性と特定遺伝子発現量に関連性があるのなら、系統間で発現量が異なる遺伝子に関連する化学物質は、感受性に系統差が生じる可能性がある。すなわち、系統間で発現量が異なる遺伝子群を明らかにすることにより、感受性に系統差を引き起こす化学物質を事前に

把握できるのではないかと考えられる。

1.2 目的

そこで本研究では、まずオオミジンコの 3 系統を対象に、通常飼育下における個体をサンプルとして RNA-seq を実施することにより、各系統の網羅的な遺伝子発現情報を比較することとした。用いた 3 系統 (NIES 系統, England 系統, Clone 5 系統) は、それぞれ日本, イギリス, ヨーロッパ各国において生態毒性試験に使用されている。Oda et al. (2006, 2007) により, NIES 系統と Clone 5 系統の間には銅に対する 48 h-EC₅₀ 値に 3.9 倍の違いが、また NIES 系統と England 系統の間にはフェノキシカルブに対する 48 h-EC₅₀ 値に 2.5 倍の違いがあることが判明している。

オオミジンコの系統間では、これまでも遺伝子発現傾向の違いが報告されている。また、系統間でゲノム全体の DNA メチル化度が異なる報告もされている。そのため、遺伝子発現制御機構である DNA メチル化が遺伝子発現制御に関与していることが疑われるが、両者の関連性については明らかにされていない。

次に遺伝子発現の系統差を基に、以下の 2 つの目的で実験を行った。

1. オオミジンコの系統間における遺伝子発現量に差を引き起こしている原因に、DNA メチル化による遺伝子発現制御が関連している可能性を検証する
2. 系統間で発現量に差のある遺伝子群に関連する生体機能を推定し、その機能を阻害する化学物質を曝露することで、系統差を引き起こす化学物質を見つけられるかを検証する

第 2 章 研究領域の既存研究

2.1 オオミジンコ系統間における化学物質の感受性の違いに関するこれまでの報告

第 1 章の背景でも説明したように、オオミジンコの系統には、産仔数やオス化の誘導、遊泳阻害など、様々な試験のエンドポイントについて化学物質に対する影響に違いが数多く報告されている。たとえば、オス化の誘導に系統差がみられた化学物質には幼若ホルモン類似物質であるフェノキシカルブやエポフェノナン (Oda et al., 2006; 2007)、産仔数に系統差を引き起こしたのものにはカドミウムや 3,4-ジクロロアニリン、マラチオン (Barata et al., 2002; OECD, 1997; Toumi et al., 2015) が挙げられている。また、急性遊泳阻害試験エンドポイントである遊泳阻害率から算出する 48 時間後の半数遊泳阻害濃度 (48 h-EC₅₀) を系統間で比較すると、系統差を引き起こした報告例が他のエンドポイントと比較して数多く存在する。そこで、既存文献から得られる系統差をその対象物質とともに表にまとめた (表 2-1)。表 2-1 では、各文献が感受性の系統差を算出する際に用いた 48 h-EC₅₀ のデータが、同じ試験機関における試験結果なのか、それとも別々の試験機関の試験結果を引用して比較しているのか、この 2 条件に基づいて既存文献を大きく 2 つに分類して提示した。表 2-1 において、前者に分類される既存文献において、カドミウムやデルタメトリンなどで 100 倍を超える感受性差が示された。一方、後者の分類される文献においても、金属類から殺虫剤まで幅広い物質で感受性差が報告されており、その中でもカドミウムに関しては最大で 100 倍程度の感受性差が報告されている。後者に挙げたような同じ研究機関における系統ごとの試験結果を比較した場合では、比較している系統ごと (研究機関ごと) に試験用水や試験操作のような外的な要因には差が出にくいと考えられる。それにも関わらず、感受性差を引き起こしているということは、感受性差を引き起こす要因に外的なものだけでなく、系統ごとの生物学的な要因も関与している可能性を示唆している。

表 2-1. オオミジンコ急性遊泳阻害試験における系統間の 48h-EC₅₀ の比

既存文献の分類条件	対象物質	系統間の 48 h- EC ₅₀ の比	引用文献
比較している系統の試験結果が別々の試験機関で実施されている	カドミウム	> 193	Baird and Barata, 1998; Haap et al., 2009
	デルタメトリン	173	Toumi et al., 2013
	亜鉛	18.3	Baird et al., 1991
	アルキルベンゼン スルホン酸ナトリウム	16	Baird et al., 1991
	六価クロム	2.8	Baird et al., 1991
	臭化ナトリウム	2.1	Baird et al., 1991
	比較している系統の試験結果が全て同じ試験機関で実施されている	カドミウム	3 – 100
マンガン		11.9	Baird et al., 1991
銅		4.5	Barata et al., 2000
フェノキシカルブ		4.1	Oda et al., 2007
3,4-ジクロロアニリン		2.1 – 3.5	Baird et al., 1991; Oda et al., 2007
セバシン酸ジブチル		2.1	Baird et al., 1991
デルタメトリン		2	Toumi et al., 2013
マラチオン		1.3	Toumi et al., 2015

2.2 *Daphnia* 属の系統間における遺伝的な相違：特に DNA メチル化に関する報告例

同種生物の個体間で感受性差を引き起こす原因の 1 つとして挙げられている遺伝的な相違に関して、第 1 章では甲殻類や藻類、魚類など様々な生物種における報告例を紹介した。この遺伝的な相違は、本研究で対象としたオオミジンコやその近縁種である *Daphnia pulex* (ミジンコ) の系統間でも報告されている。例えば、Orsini et al. (2018) や Becker et al. (2018) は、異なる採取起源の系統間で遺伝子発現量を網羅的に解析したところ、その発現の傾向に違いがあることを報告している。このほかにも、塩基配列の変異や重複等のゲノム変異 (Chaturvedi et al., 2021; Keith et al., 2016; Wang et al., 2016)、それに加えてエピジェネティック修飾の 1 つである DNA メチル化度がゲノム全体や特定遺伝子において系統間で異なることも明らかになっている (Asselman et al., 2015; Hearn et al., 2021)。DNA メチル化は、遺伝子プロモーター領域に生じると、転写因子の結合を阻害し mRNA の合成をできなくすることで、遺伝子発現量が減少させる遺伝子発現の制御機構である。哺乳類等では、DNA メチル化による遺伝子発現量の制御が化学物質感受性にも影響を与えることが分かっている (Vandenbussche et al., 2020)。その一方で、オオミジンコでは上述したように DNA メチ

ル化と遺伝子発現量の系統差が個々に明らかにされているものの、DNA メチル化と遺伝子発現量の関連性は示されていない。

オオミジンコにおける DNA メチル化に関する知見では、オオミジンコに DNA メチル化阻害剤 5-アザシチジンを 14 日間曝露した時に、特定遺伝子の DNA メチル化度が減少することが分かっている (Athanasio et al., 2018)。5-アザシチジンによって DNA メチル化度が減少すると、DNA メチル化による発現抑制が外れることにより、その遺伝子発現量が上昇する。系統間で発現量が異なる遺伝子の発現制御に DNA メチル化が関与している場合、5-アザシチジンを曝露した時に発現量が上昇するかどうかを計測することにより DNA メチル化制御の可能性を確認することができる。つまり、5-アザシチジンは、オオミジンコにおいて DNA メチル化と遺伝子発現量の関係性を探る上で有用なツールになり得ると考えられる。

2.3 網羅的な遺伝子発現解析を用いた *Daphnia* 属系統間の化学物質の感受性差の原因解明に関する報告

遺伝子発現量を網羅的に解析する手法である RNA-seq やマイクロアレイ手法を用いて、系統間における化学物質への感受性差の原因解明を行っている報告例を紹介する。その具体的な研究例として、Lyu et al. (2019) は、タイリクミジンコ (*Daphnia similoides*) における、藻類毒への耐性を持つ系統と試験で一般的に使用される系統 (TH09 と TH14) を対象に、RNA-seq 解析により藻類毒への応答遺伝子の発現量を系統間で比較している。それにより系統間で発現量が大きく異なっていた特定の遺伝子群 (具体的にはグルタチオンやアミノ酸、糖代謝に関与する遺伝子) と藻類毒との関連性を示唆している。Latta et al. (2012) は、ミジンコを対象に、塩耐性を持つ系統と塩耐性を持たない系統を、マイクロアレイを用いて比較することで、系統間で発現量の異なる遺伝子群 (具体的にはイオン輸送や浸透圧保護に関与する遺伝子) と塩耐性の関連性を示唆している。また、Chain et al. (2019) は、ミジンコを対象に、銅汚染されている場所から採取した系統と銅汚染されていない場所から採取した系統を、RNA-seq 解析で比較することで、非汚染地点の系統の方が、グルタチオン S トランスフェラーゼ等の様々なストレス応答遺伝子群の発現量が低いことを明らかにした。これらの文献のように、これまでの *Daphnia* 属における既存研究のアプローチは、あらかじめ特定物質に対する感受性差が判明している系統を対象に、その感受性差の原因解明に遺伝子発現解析手法を用いて、感受性と遺伝子発現量の関連性を示唆している。

第 3 章 オオミジンコ 3 系統の遺伝子発現の比較と DNA メチル化の評価

3.1 研究目的と概要

オオミジンコの系統間では、全ゲノムの DNA メチル化度や個々の遺伝子の DNA メチル化度に違いがあることが複数の既存文献で明らかにされている (Asselman et al., 2015; Athanasio et al., 2018; Hearn et al., 2021)。遺伝子プロモーター領域における DNA メチル化はその遺伝子発現を制御する。そのため、系統間における DNA メチル化度の違いは、系統間で確認されている遺伝子発現量の違いの原因の 1 つではないかと考えられる。そこで第 3 章では、異なるオオミジンコ系統の遺伝子発現量の違いを引き起こしている原因に DNA メチル化が関連している可能性を検証することを目的とした。

まずは、対象としたオオミジンコ 3 系統の RNA-seq から得られる網羅的な遺伝子発現情報をもとに、各系統で遺伝子発現量が大きく異なる遺伝子群を選定し、その中でも DNA メチル化による遺伝子発現制御の起きている可能性の高い CpG 領域 (塩基配列中にシトシンとグアニンを多く含む DNA 領域) をプロモーター領域に含む遺伝子を抽出した。次に DNA メチル化阻害剤の 5-アザシチジンをミジンコに曝露することにより、選別した遺伝子の発現量が上昇するかどうかを検証した。

3.2 実験方法

3.2.1 対象生物の情報と飼育条件

対象生物としたオオミジンコ (*Daphnia magna*) の系統は、NIES 系統と England 系統、Clone 5 系統の 3 系統とした。1. NIES 系統: USEPA から譲渡された系統で、日本の GLP 適合試験機関や研究機関の多くが使用している。2. England 系統: 英国環境庁から譲渡された系統で、元はヨーロッパで使用されることが多い Clone A 系統である。3. Clone 5 系統: 化学物質評価研究機構から譲渡された系統で、England 系統と同様に起源は Clone A 系統である。いずれの系統も、国立環境研究所にて 15 年以上の継代飼育がされてきた。飼育条件は、M4 培地 (pH 7.5–8.5, 硬度 250 mg/L-CaCO₃) 1 L に 35 匹程度の個体を入れ、週に 3 回水替えを行っている。また、光周期は、明期 16 時間、暗期 8 時間で、水温を 20±2° C に保っている。餌は、*Chlorella* sp. (5.0×10⁸ cells/mL/day) を 1 mL, yeast-cerophyll-trout chow (YCT) を 1 mL, 各 1 L ビーカーに毎日投入した。

3.2.2 基礎データの取得方法

NIES 系統, England 系統, Clone 5 系統の 3 系統を対象に、生後 24 時間以内個体と 2 週齢個体の 2 つの成長段階における基礎データ (体長, 乾燥重量, 脱皮回数) を取得した。体長は、計測する個体の顕微鏡写真をスケール付きで撮影した後、その画像データをもとに、ImageJ software (Abramoff et al., 2005) を用いて、頭頂部から尻尾の付け根までを体長と定義して計測した (図 3-1 参照)。体長の定義は、先行研究の Cambroner and Orsini (2018) を参考にした。尻尾を含めなかった理由は、オオミジンコの尻尾部分は個体によっては折れている場合があり、尻尾を含めると正確な定量ができないと判断したためである。乾燥重量の計測には、凍結乾燥機 (FDU-2200, EYELA) を用いた。生後 24 時間齢個体の乾燥重量の計測では、電子天秤 (XS205DUV, SANYO) の測定精度 (0.01 mg) では、1 匹ずつでは定量できないため、各系統の生後 24 時間齢個体を 50 匹収集したものを 1 サンプルとして計測を実施した。脱皮回数の計測は、3 系統を対象に、生まれてから生後 8 日目までの脱皮回数を計測した。計測を生後 8 日目までにした理由は、生後 8 日を過ぎると多くの個体で産仔が始まり、純粋な脱皮回数として計測できなくなるためである。



図 3-1. 本研究におけるオオミジンコの体長の定義を赤ラインで示してある (Cambronero and Orsini, 2018 の体長基準より)。

3.2.3 Cytochrome oxidase I (COI) 配列情報の取得方法

オオミジンコの各 3 系統の系統関係を明らかにするため、生物の進化を研究する上で利用されることが多いミトコンドリア DNA 配列上に存在する COI 領域を各系統で比較することとした。まず、2 週齢をサンプルとして、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を使用して、DNA を抽出した。次に、抽出した DNA をサンプルとして、Folmer et al. (1994) が提案する COI 領域を特異的に増幅できるプライマーと EXTaq (Takara) を増幅酵素として用いて、Thermal Cycler Dice (Takara) によって、以下のプログラムで PCR を実施した: 94°C で 60 秒, 続いて 94°C で 15 秒を 30 サイクル, 58°C で 30 秒, 72°C で 30 秒。増幅した PCR 産物は、COI 領域が特異的に増幅されているか、アガロースゲルを用いた電気泳動法により確認した。そして、特異的な増幅が確認できた PCR 産物は FASMAC Corp. に委託して、サンガー法によりシークエンスすることで、COI 領域の塩基配列情報を各系統で取得した。各系統の COI 配列情報については、(National Center for Biotechnology Information (NCBI) に accession number をつけて情報を開示した (OL518111 [NIES]; OL518107 [England]; OL518110 [Clone 5])。

3.2.4 RNA-sequencing の実験操作

オオミジンコの各 3 系統の 2 週齢個体から 10 個体を収集して 1 サンプルとした。各系統のサンプル数は 3 つ用意した。Total RNA の抽出には、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いた。抽出した RNA は TapeStation (Agilent Technology Inc.) にて、RNA 濃度 (> 140 ng/μL) および純度 (> 8.5) を確認し、これ以降の実験に使用するサンプルはこの 2 つの条件を満たしたものを使用した。ここまでの一連の過程で抽出した Total RNA サンプルから cDNA ライブラリの作成する過程は、マクロジェン社に委託した。委託した内容は、サンプルから抽出した Total RNA から mRNA のみを精製して、それを用いて、TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit (Gold) を用いて、cDNA ライブラリを作成した。全 cDNA ライブラリを NovaSeq™ 6000 を使用して、101 bp paired-end にて塩基配列を解析した。

3.2.5 遺伝子発現変動解析 (Differentially Expressed Genes: DEGs)

HISAT2 ver. 2.2.0 (Kim et al., 2019) を使用して、RNA-seq から得られた塩基配列情報をオオミジンコ KIT 系統の参照配列にマッピングした。HTseq ver. 0.11.3 (Anders et al., 2015) を用いて、マッピングされた情報から、各遺伝子の遺伝子発現量を “read count” として解析した。得られた “read count” を R software のパッケージの edgeR ver. 3.28.1 (Robinson et al., 2009) を用いて次に示す発現量の正規化を行った。“read

count”は Trimmed Mean of M value (TMM) 法により正規化し、その上で、Count Per Million (CPM) が 0.5 を下回る遺伝子に関しては、解析の精度が低い可能性が高いため、解析対象外とした。発現変動遺伝子の定義は、FDR < 0.05 かつ fold change (系統間の発現比) > 2 の 2 つの条件に当てはまる遺伝子として出力した。

3.2.6 対象遺伝子の DNA 配列中の CpG 領域の有無を確認

NCBI のゲノム配列情報から、各遺伝子の DNA 配列情報を取得した。その配列情報をもとに、CpG 領域の有無を GENETYX software ver. 10 (Genetyx inc.) を使用して解析した。一般的に、DNA メチル化は、遺伝子の塩基配列中のプロモーター領域の CpG 領域にメチル基が付加することで遺伝子発現を制御する機構である。そのため、CpG 領域を検索する対象は、各遺伝子のプロモーター領域に限定する必要があるが、オオミジンコの配列情報にプロモーター領域の情報はない。そこで、各遺伝子におけるタンパク質コーディング領域から上流 5000 bp をプロモーター領域と仮定した。なお、CpG 領域の定義は、Gardiner-Garden and Frommer (1987) に従い、DNA 配列中の 4 種類の塩基の内、シトシンとグアニンの含有量が 50% を超える 200 塩基対以上の配列とした。

3.2.7 オオミジンコへの DNA メチル化阻害剤の影響

DNA メチル化による遺伝子発現量への影響を確認するため、DNA 複製時の DNA メチル基転移阻害作用を有する化学物質 5-アザシチジンをオオミジンコに曝露した時の遺伝子発現量の変化を確認した。そのために、5-アザシチジンがオオミジンコに対して、DNA メチル化阻害を引き起こす濃度を事前に把握する必要がある。そこで、5-アザシチジン自体の一般毒性 (DNA メチル化阻害作用以外の毒性) の影響を調べるため、NIES 系統と England 系統の 2 系統を対象に急性遊泳阻害試験 (OECD TG202) を実施することで生存への影響を確認した。試験の曝露濃度は Lindeman et al. (2019) を参考に、Control, 12.8, 32, 80, 200, 500 mg/L の 6 濃度区で実施した。この結果から算出される最小影響濃度 (LOEC) および無影響濃度 (NOEC) をもとに 7 日間の曝露試験であるミジンコ幼若ホルモン短期検出法 (Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using *Daphnia magna*: JHASA) に準拠して、2 週齢に対して 5-アザシチジンを 1 週間曝露することにより、5-アザシチジンの体長と増殖への影響を確認した。本研究で実施した JHASA の試験条件を以下の表 3-1 にまとめた。

表 3-1. 本研究における JHASA の試験条件

対象種・系統	<i>Daphnia magna</i> の NIES 系統と England 系統
試験物質	5-アザシチジン
試験培地	M4 培地
繰り返し数	各濃度区につき n=10
試験期間	7 日間
試験容量	50mL/個体/容器
給餌量	クロレラ (5×10^8 cells/mL) 50 μ L/個体/日, YCT 50 μ L/個体/日
光条件	16L:8D
温度	20°C \pm 2°C 以内
個体齢	2 週齢個体内、産仔を終えた直後の個体
換水	週 2 回以上
観察項目	体長, 産仔数

3.2.8 リアルタイム PCR (定量 PCR)

DNA メチル化阻害剤である 5-アザシチジンの DNA メチル化阻害の効果を確認するため、5-アザシチジンの曝露後の遺伝子発現量の変化を確認した。5-アザシチジン曝露個体を確保するため、NIES 系統と England 系統の 2 週齢個体を対象に 3.2.7 で決定した曝露濃度で 7 日間の曝露を行った。なお、5 個体を 1 サンプルとして、繰り返しを 3 サンプル用意した。各サンプルを 2.0 mL のスクリュウキャップチューブに入れ、5 mm のジルコニアビーズとともに、Micro Smash MS-100 (TOMY) にて破碎した。Total RNA は 700 μ L の QIAzol reagent で抽出した後に、miRNeasy Mini Kit を用いて精製した。精製した RNA 中には、miRNeasy Mini Kit 付属の DNA 切断酵素である DNase だけでは除去しきれなかった DNA が微量に存在する。この微量に含まれる DNA は PCR 時に mRNA と同じように増幅されることで結果に反映されてしまうため、TURBO™ DNase (Thermo Fisher) を用いて完全に除去した。DNA 除去を行った各サンプルを NanoDrop™ ND-1000 Spectrometer にて、RNA 濃度 (> 100 ng/ μ L) と純度 (260/280/> 1.8) を確認した。確認後、各サンプルから 500 ng の RNA を取り出して、AMV Reverse Transcriptase XL (Takara) にて逆転写することで、cDNA を合成した。各サンプルから合成した cDNA を Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche) にて定量 PCR を実施した。PCR は、95°C で 300 秒、95°C で 10 秒を 50 回、64°C で 10 秒、72°C で 10 秒の流れのプログラムで実施した。各遺伝子発現量を正規化するために、18srRNA の遺伝子発現量で各遺伝子発現量を除した値を相対的な遺伝子発現量として評価した。なお、定量 PCR に用いた各遺伝子のプライマーは、対象とする遺伝子の mRNA の配列情報を NCBI から取得し、その配列情報をもとに primer3 ver. 0.4.0. (Untergasser et al., 2012) を用いてプライマー配列を作成した。さらに、作成したプライマーの特異性は NCBI の BLAST 機能で確認した。定量 PCR に用いたプライマー配列情報は表 A-1 にまとめた。

3.3 結果と考察

3.3.1 オオミジンコ 3 系統の基礎情報の取得：形態的特徴 (見た目や体長、乾燥重量、脱皮数) とミトコンドリア DNA 配列情報

図 3-2A に、対象とした 3 系統である NIES 系統と England 系統、Clone 5 系統の外見上の特徴を示した。図 3-2B, C より、各成長段階において、体長の大きさ関係は次のようになった: Clone 5 系統 < England 系統 < NIES 系統。2 週齢の乾燥重量に関しても、体長と一致して Clone 5 系統 < England 系統 < NIES 系統の順となった (図 3-2D)。一方で、生後 24 時間以内の個体の乾燥重量に関しては、系統間に有意な差はなかった (図 3-2E)。成長段階初期では、個体の形態的特徴は形成しきっていないため (Martinez, 2012)、形態的特徴の中でも、特に乾燥重量のような量的な特徴については、生後間もない 24 時間以内の個体では系統による違いが表れなかったと考えられる。2 週齢で確認できた系統間の成長の差を引き起こす 1 つの要因として、脱皮の回数が考えられる。一般的に昆虫類では、脱皮回数と体長には関連性が示唆されている。そこで生後 8 日間の脱皮回数を調べたところ、系統間で有意な差はなかった (図 3-2F)。体長に関しては、生後 24 時間齢と 2 週齢のどちらも系統差があったことから、脱皮回数の計測期間である 8 日目においても成長に差があることが予想される。一方で、成長の差の原因として計測した 8 日間の脱皮回数には系統差がないことから、成長の差には脱皮回数以外の成長制御に関わる機構が関与していると考えられる。ミトコンドリア DNA の一部である 486 bp の COI の配列の相違については、NIES 系統と England 系統は完全に一致しており、Clone 5 系統のみ 1 塩基の相違が確認された。3 系統の COI 配列の比較結果から、これらの 3 系統は取得起源が近い系統ではないかと考えられる。

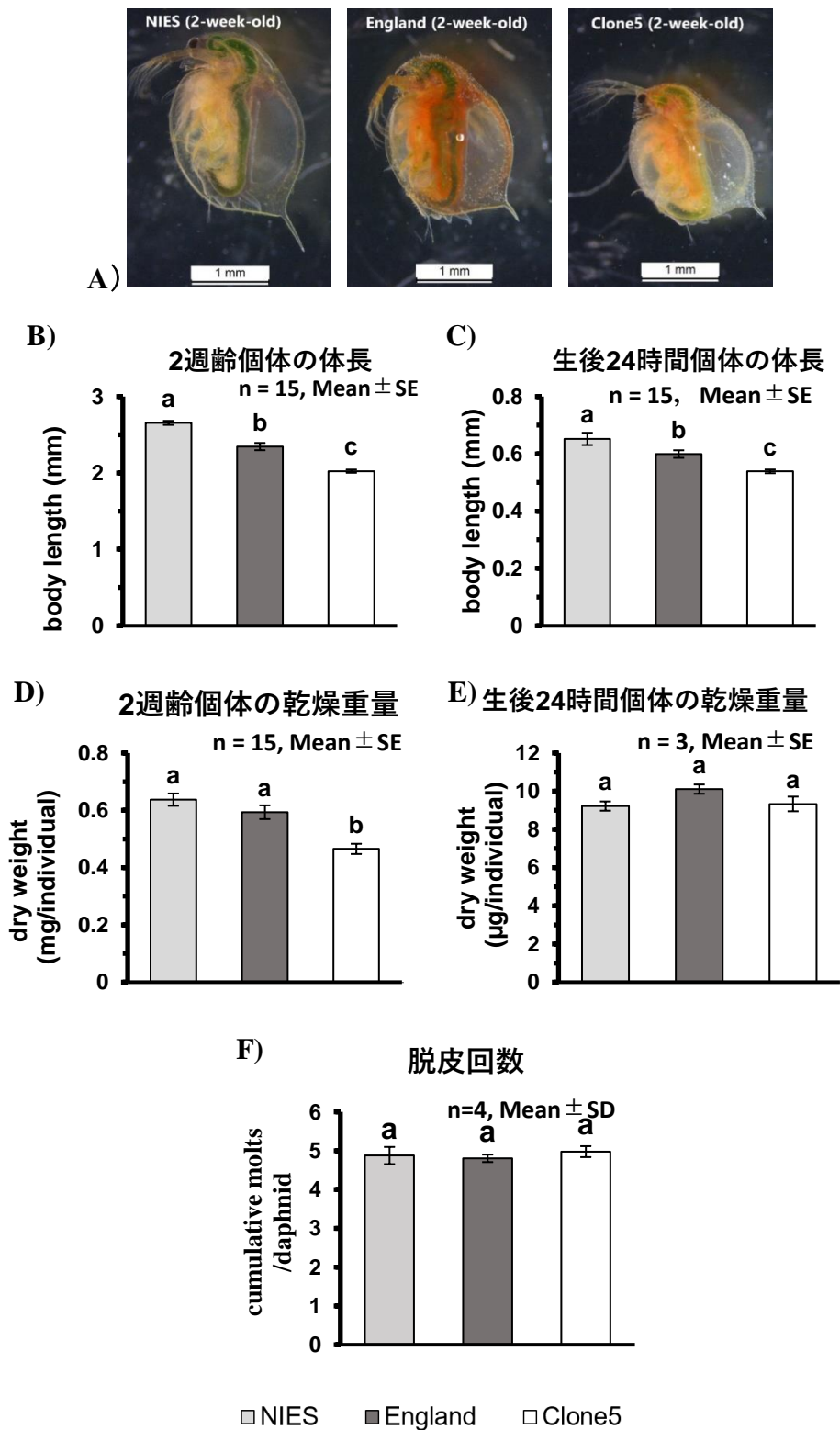


図 3-2. オオミジンコ 3 系統の基礎データの比較を 2 週齢個体と生後 24 時間個体で行った結果 (Mean ± SE)。(A)と(B)は体長。(C)と(D)乾燥重量。(E)は、生まれてから産仔開始直前までの脱皮数。(A)-(D)におけるエラーバー上部に記載したローマ字の違いは、Tukey's HSD test により 3 系統を比較した際に $p < 0.05$ となるものを示した。

3.3.2 RNA-sequencing による各系統の遺伝子発現情報の違い

オオミジンコの各系統における網羅的な遺伝子発現情報を比較するため、通常飼育条件下における 2 週齢個体を対象に RNA-seq 解析を実施した。RNA-seq から得られた全リード数等の遺伝子情報は表 A-2 にまとめた。RNA-seq の実験結果から、系統間で発現が異なっていた遺伝子を解析した結果、3 系統全体で 724 遺伝子の発現量が有意に異なっていた (FDR $p < 0.05$)。それらの遺伝子の中で、NIES 系統と Clone 5 系統間で 657 遺伝子、Clone 5 系統と England 系統間で 108 遺伝子、England と NIES 系統間で 724 遺伝子の発現が有意に異なっていた。つまり、発現変動していた遺伝子の数から判断すると、England 系統と Clone 5 系統は発現の傾向が似ていて、NIES 系統と England 系統は、発現の傾向が最も異なっていることが分かる。これらの発現変動遺伝子の中でも 3 系統を比較したときに、どの系統を比較しても発現量が異なっていた 63 遺伝子を対象に階層クラスタ解析を実施したところ、NIES 系統では他 2 系統と比較して遺伝子発現傾向が大きく異なることが分かった (図 3-3)。このように、系統間で発現傾向が異なることはオオミジンコだけでなく、近縁種であるミジンコでも確認されている (Orsini et al., 2018; Becker et al., 2018)。今回用いた 3 系統のなかでは、NIES 系統と England 系統の間の発現傾向により顕著な違いがあったことから、以降の実験はこの 2 系統に絞って行った。

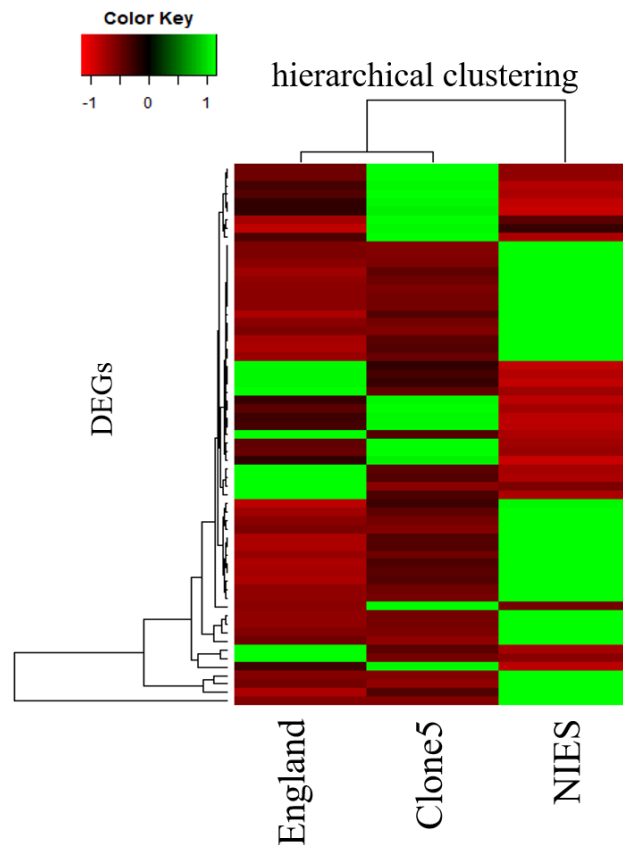


図 3-3. オオミジンコ 3 系統の DEGs のヒートマップと階層クラスタ解析の結果。3 系統で実施した RNA-seq の解析結果から得られた DEGs (3 系統間で発現比 2 倍以上かつ FDR p -value < 0.05) を対象にした。左上の“Color key”の色は、各遺伝子の系統間の発現比の大小を意味する (例えば、緑色ならその系統で発現量が大きいことを意味する)。また、クラスタ解析の結果は、ヒートマップ上部に示した。

3.3.3 DNA メチル化解析の対象とする遺伝子の選定（発現量の系統間比較と CpG 領域の検索）

遺伝子発現の傾向が顕著に異なる，NIES 系統と England 系統を比較した時に，NIES 系統で England 系統よりも発現量が 10 倍以上高い遺伝子，また England 系統で NIES 系統よりも発現量が 10 倍以上高い遺伝子をそれぞれ抽出した。またそれらの遺伝子の中でも，DNA メチル化が起こり得る CpG 領域を，コーディング領域上流 5000 bp（オオミジンコにおけるプロモーター領域として仮定した DNA 領域）に含む遺伝子をリスト化した（表 3-2）。なお，本研究における CpG 領域の定義は，Gardiner-Garden and Frommer（1987）の基準と同じ CG 含有量が 50%以上の 200 bp の DNA 領域とした。表 3-2 では，上から 4 番目までの遺伝子は NIES 系統で発現量が特異的に高い遺伝子群，上から 5 番目以降までは England 系統で特異的に発現量が高い遺伝子群としている。つまり，上から 4 番目までの遺伝子群は，England 系統において DNA メチル化により遺伝子発現制御が起きている可能性のある遺伝子であり，上から 5 番目以降の遺伝子は NIES で DNA メチル化の可能性が疑われる遺伝子である。各系統で発現量が高かった遺伝子の機能に着目すると，NIES 系統では *chymotrypsin 1 like* や *transmembrane protease serine 9 like* のような消化酵素に関わる遺伝子の発現量が高く，図 3-2BCD で確認された体長や乾燥重量の差にも関与していることが考えられる。一方，England 系統では，*lactosylceramide 4-alpha-galactosyltransferase-like* や *glucose dehydrogenase [FAD quinone] like* などの糖代謝に関わる遺伝子発現量が多い特徴が確認できた。

表 3-2. NIES 系統と England 系統で発現比が大きかった 10 遺伝子の発現量と DNA 配列中の CpG island のカウント数

遺伝子 ID	遺伝子名	発現量			発現比 (NIES/England)	CpG 領域の 数
		NIES 系統	England 系 統	Clone 5 系 統		
LOC116931 625	vacuolar protein sorting-associated protein 26C-like	13.9	0.1	0.1	209.5	1
LOC116922 711	chymotrypsin 1 like	1791. 8	27.2	74.3	65.9	1
LOC116932 072	mucin-5AC-like	1.4	0.1	0.1	20.5	1
LOC116919 290	transmembrane protease serine 9-like	19.3	1.7	1.6	11.5	1
LOC116931 895	prostaglandin G/H synthase 2-like	1.7	20.0	9.6	11.5	2
LOC116920 911	postacrosomal sheath WW domain-binding protein-like	0.1	295.9	121.1	0.0004	2
LOC116926 060	lactosylceramide 4-alpha- galactosyltransferase-like	0.1	4.9	2.4	0.0134	1
LOC116924 362	glycine-rich protein 1-like	0.7	23.2	29.4	0.0293	1
LOC116928 942	glucose dehydrogenase [FAD quinone] like	1.6	29.9	47.6	0.0521	1
LOC116923 449	prisilkin-39-like	0.1	2.1	3.4	0.0541	2

3.3.4 DNA メチル化阻害剤のオオミジンコへの毒性影響の確認

定量 PCR に用いるサンプルを調整するため、5-アザシチジンがオオミジンコに対して、DNA メチル化阻害を引き起こす濃度を明らかにする必要がある。そのためにまず、NIES 系統と England 系統の 2 系統を対象に急性遊泳阻害試験を実施することとした。定量 PCR を行うサンプルの調整のために、5-アザシチジンがオオミジンコに対して、DNA メチル化阻害を引き起こす濃度を明らかにする必要がある。そのために実施した NIES 系統と England 系統の 2 系統における急性遊泳阻害試験の結果を表 3-3 にまとめた。両系統の 48 h-EC₅₀ の値は、既存文献値の 230.1±98.4 (Lindeman et al., 2019), 310±11 (Athanasio et al., 2010) と同程度であった。先行研究では、この 48 h-EC₅₀ の半値もしくは急性遊泳阻害試験における NOEC において、特定遺伝子の DNA メチル化度の低下を引き起こすことが判明している (Athanasio et al., 2018)。そこで、今回実施した急性遊泳阻害試験における NOEC と LOEC を調べたところ 2 系統で一致して、それぞれ 20 mg/L, 80 mg/L となった。このうち NOEC の 20 mg/L を最高濃度として NIES 系統の 2 週齢個体を対象に JHASA に準拠して 7 日間曝露した。JHASA では、5-アザシチジンによる一般毒性として 2 週齢個体の体長と産仔数の 2 つの項目を考慮して、この 2 つの項目に影響が出ない最高の曝露濃度を求めることを目的とした。JHASA を実施した結果、いずれの濃度区でも体長には有意な変化は見られなかった (図 3-4, Dunnett's test で各濃度区と対象区を比較)。その一方で、産仔数は最高濃度区の 20 mg/L で対照区に対し有意に減少した (図 3-5)。

表 3-3. 各系統における 5-アザシチジンの急性遊泳阻害試験の結果

	NIES	England
48 h-EC ₅₀	251 mg/L	153 mg/L
LOEC (最低影響濃度)	80 mg/L	80 mg/L
NOEC (無影響濃度)	20 mg/L	20 mg/L

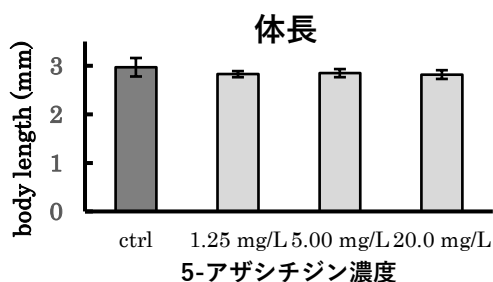


図 3-4. 5-アザシチジン 7 日間曝露試験における体長 (平均±SD, n=15)。

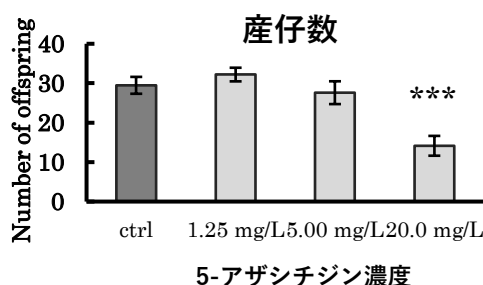


図 3-5. 5-アザシチジン 7 日間曝露試験における産仔数 (平均±SD, n=15) ***は対照区と比べた統計学的な有意差を示す (***: $p < 0.001$, Dunnett's test)

3.3.5 DNA メチル化阻害剤による遺伝子発現量の変化の確認

以上の結果から、5-アザシチジンが体長と産仔数に影響を及ぼさない最高濃度が 5.0 mg/L であることが分かった。ただし、32 mg/L でも仔虫の生存に影響がなかったこと、また、20.0 mg/L でも体長には影響がなかったことから、遺伝子発現量を計測するためのオオミジンコ 2 週齢サンプルへの 5-アザシチジン曝露濃度は、JHASA の実施時と同じく、1.25, 5.00, 20.00 mg/L の 3 濃度区とした。図 3-6 に 5-アザシチジンを曝露した時の NIES 系統と England 系統における遺伝子発現量を示した。図 3-6 中の上 4 つのグラフは、コントロール遺伝子として用いた *GAPDH* (解糖系に關与する遺伝子) と *ACTIN* (細胞骨格に關与する遺伝子) の結果である。2 つの遺伝子の発現量の結果を比べると、*GAPDH* の方が各濃度区のサンプル間のばらつきが小さく、濃度区間における変動も少ない。コントロール遺伝子は、以降のターゲット遺伝子の相対的な遺伝子発現量を算出する際に用いるため、測定精度の高い *GAPDH* を内在性コントロール遺伝子として用いることにした。図 3-6 中の下 8 つのグラフは、ターゲット遺伝子とした 10 遺伝子 (表 3-2) の中で、定量 PCR による特異的な増幅が確認できた 4 つの遺伝子 (*serine 9*, *postacrosomal*, *glucose*, *prostaglandin*) の結果である。なお、残りの 6 遺伝子については、PCR 終了時の PCR 産物の遊離曲線におけるピークポイントがサンプルごとに異なっていたことから、特異的な増幅が確認できなかつたと判断した。特異的に増幅された 4 つのターゲット遺伝子の内、NIES 系統において *postacrosomal* と *prostaglandin* は、5-アザシチジン曝露により発現量が上昇する傾向が見られた。具体的に *postacrosomal* では NIES 系統における対象区から 5-アザシチジンの 5.0 mg/L までの濃度区において、徐々に発現量が上昇し、20 mg/L 濃度区で大幅に減少する傾向が見られた。図 3-5 より 20 mg/L 濃度区では産仔数への影響があったことから判断して、5-アザシチジンを 20 mg/L 曝露した場合、DNA メチル化阻害以外の毒性により遺伝子発現量が減少したのではないかと考えられる。この 2 つの遺伝子のオオミジンコにおける機能は不明だが、他生物種における機能を参考にすると、*postacrosomal* は、精子形成における先体反応時に発現する遺伝子であることが分かっている (Wu et al., 2007)。基本的にメスの単為生殖であるオオミジンコにおいて、精子形成に關連するのはオスの產生に關わる何らかのメカニズムと考えられる。そのため今後の検討として、例えば、5-アザシチジンと幼若ホルモン作用を持つ化学物質を共曝露した時に、幼若ホルモン単独曝露時と比較してオス化の誘導率が変化するかを観察することにより、この遺伝子機能の一部が解明されていく可能性が考えられる。もう一つの *prostaglandin* は、炎症等の痛みとともにアラキドン酸から合成される生理活性物質と言われている。図 3-6 から、NIES 系統の対照区ではほとんど発現がないにも関わらず、20.0 mg/L の 5-アザシチジン曝露濃度区では、発現が上昇している傾向が確認できたため、DNA メチル化阻害による発現制御が外れた可能性、もしくは、5-アザシチジンの一般毒性への応答として、単に発現量が上昇している可能性も考えられる。

定量 PCR を実施した全ての遺伝子に共通して、同じ曝露区におけるサンプル間の発現量のばらつきが大きく、検定による有意差が付きにくいデータとなった。5-アザシチジンによる遺伝子発現量の変化を正確に確認するには、サンプル間のばらつきを抑えることで、定量の精度を改善する必要があることが分かった。

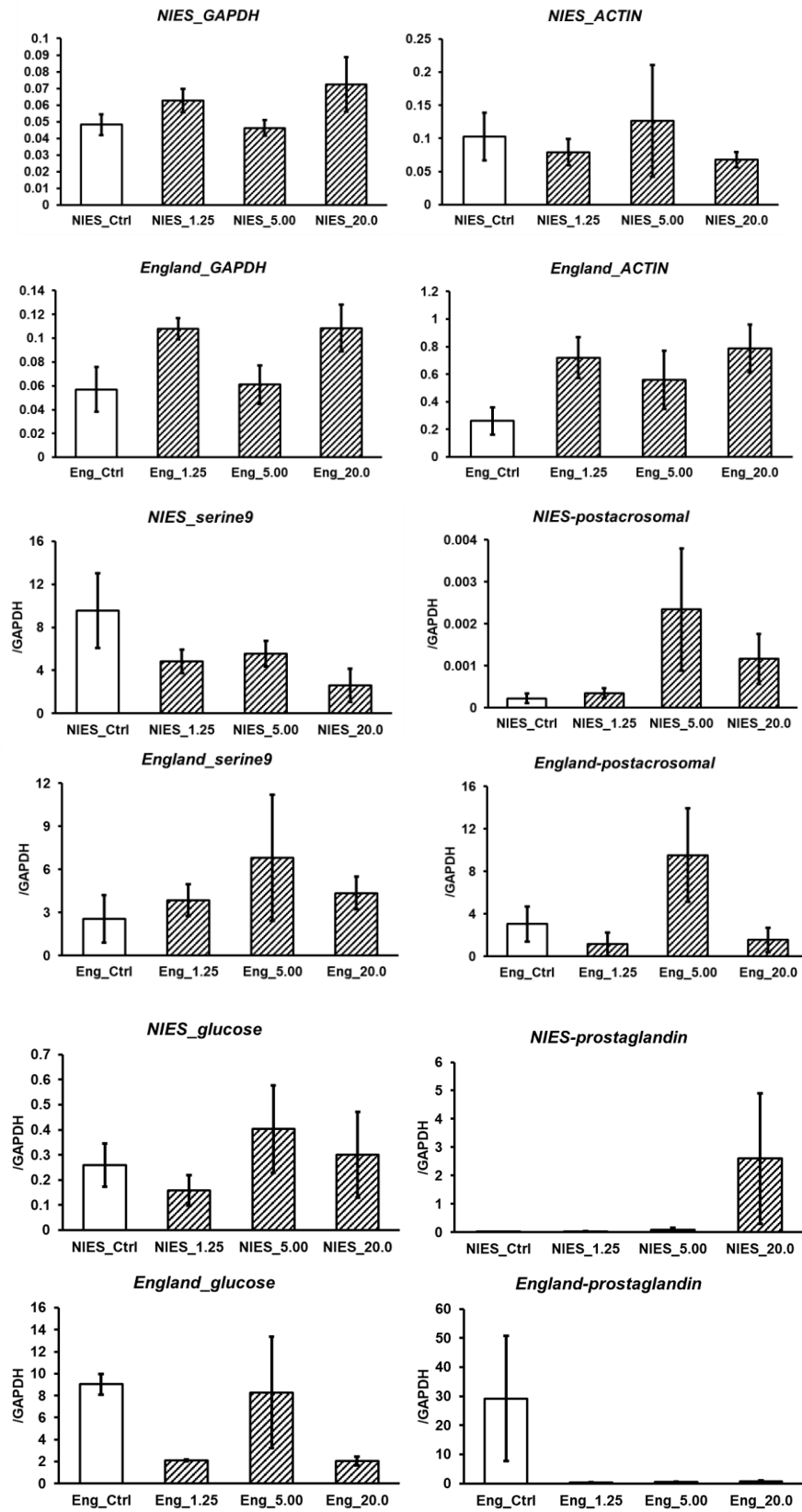


図 3-6. 5-アザシチジン曝露による遺伝子発現量変化。サンプルは、NIES 系統と England 系統の 2 週齢個体を用いた。各系統において、Control 区と 5-アザシチジン曝露濃度区との遺伝子発現量を Dunnett' test にて検定を行った。

3.3.6 オオミジンコ 2 週齢を用いた定量 PCR におけるサンプル間の遺伝子発現量の精度の改善

これまでの定量 PCR ではサンプル間の発現量の差が大きかったことから、今後の定量 PCR 実験の精度を上げるために、サンプル間の発現量のばらつきを生じさせている原因を探ることとした。考えられる原因の中で、一番可能性が高いと考えられるのは、サンプルとしたオオミジンコ 2 週齢個体に含まれる育房中の胚の影響である(図 3-7 参照)。オオミジンコでは、胚発生の段階で短期的に発現量が大きく変動する遺伝子群(ハロウィン遺伝子と呼ばれる脱皮の制御に関わる遺伝子群など)の存在が明らかになっている(Sumiya et al., 2018)。これまで定量 PCR に用いてきたサンプル中は、胚が含まれている個体とそうでない個体をランダムに選んでいたため、サンプル間のばらつきに胚の発現が影響している可能性が考えられる。この可能性を検証するため、図 3-6 で用いた遺伝子の中から 4 つの遺伝子を対象に、NIES 系統の 2 週齢個体における、育房中に胚が含まれる個体(embryo+)、育房中の胚を取り除いた個体(embryo-)、2 週齢から採取した胚(embryo_only)の 3 種類で定量 PCR を実施した。



図 3-7. オオミジンコの写真。個体の育房中に含まれる胚の部分を赤枠で囲った。

胚による遺伝子発現量の影響を調べた結果を図 3-8 に示した。コントロール遺伝子の *GAPDH* における embryo-では、2 週齢個体から胚を取り除くことで変動係数が 0.23% から 0.11%に低下した。一方で、*ACTIN* では、胚のみの発現量があるためそれを取り除いた embryo-では変動係数が小さくなるかと思われたが、結果としては胚を含んだ 2 週齢個体サンプル(embryo+)でばらつきが一番小さくなった。

図 3-8 中の 2 つのターゲット遺伝子のうち、*serine 9* では、胚の発現量が大きく、胚を取り除くことで変動係数が 0.63%から 0.23%に抑えられた。一方で、*postacrosomal* では、胚の発現量がなかった。つまり、遺伝子によって胚の有無が遺伝子発現量に影響する場合とそうでない場合があることが分かった。また、*postacrosomal* では、同じ 2 週齢個体でも、胚を取り除いた 2 週齢個体と胚を含んだ 2 週齢個体の発現量に違いがあったことから 2 週齢個体自体の生物学的な周期によっても発現量が大きく異なる可能性が示唆された。

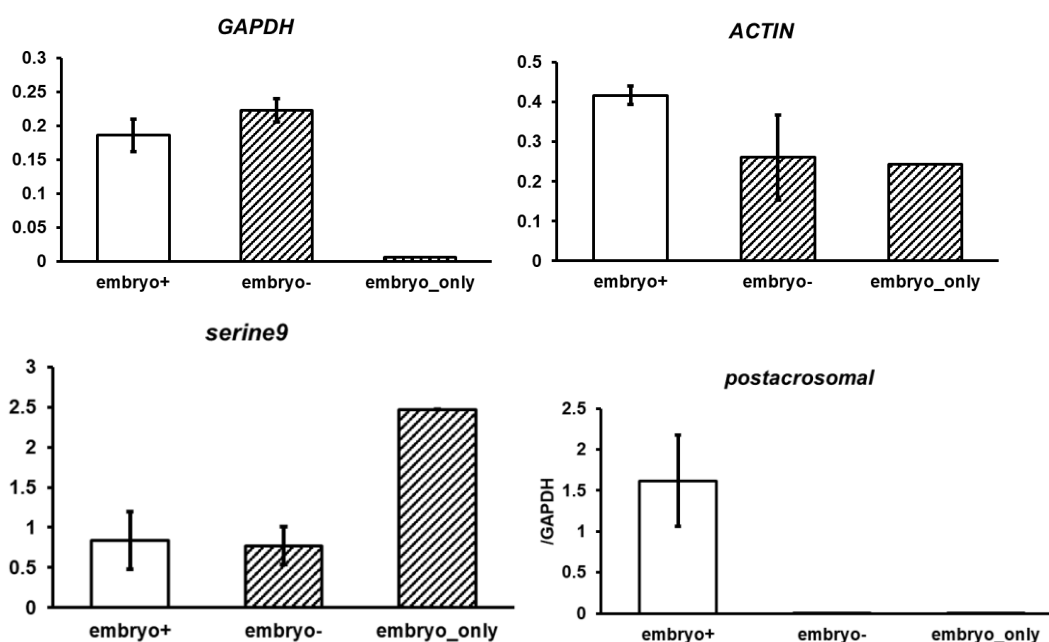


図 3-8. 定量 PCR の結果。各遺伝子事に育房中に胚が含まれる個体 (embryo+; N = 2, Mean ± SD), 育房中の胚を取り除いた個体 (embryo-; N = 2, Mean ± SD), 2 週齢からとった胚のみ (embryo_only; N = 1) の 3 サンプルの遺伝子発現量を示してある。

3.4 第 3 章のまとめ

第 3 章では、系統間で異なる遺伝子発現量の原因に、DNA メチル化が関与していないか DNA メチル化剤の検証を定量 PCR で実施した。定量 PCR を実施した複数の遺伝子で、DNA メチル化阻害剤による遺伝子発現量の上昇の傾向は見られたものの、有意性はなく、DNA メチル化阻害剤により遺伝子発現量が上昇した遺伝子は確認されなかった。有意な上昇が見られなかった原因の 1 つとして、オオミジンコにおいて DNA メチル化制御されている遺伝子が少ない可能性が挙げられる。その理由は、オオミジンコのゲノム全体の DNA メチル化が 1%程度と、他の甲殻類 (例えばヨコエビでは 7%程度 (Alves et al., 2021)) と比較して低く (Athanasio et al., 2018), 各遺伝子配列中にメチル基が付加している可能性が低いからである。

また、遺伝子発現量の有意な上昇が見られなかったもう 1 つの原因として、サンプル間のばらつきが大きく、濃度区間ごとの正確な比較が行えなかったことが挙げられる。サンプル間のばらつきの原因を探るため、定量 PCR に用いるオオミジンコの 2 週齢個体から胚を取り除いたところ、GAPDH や serine 9 では、サンプル間のばらつきが比較的抑えられることが分かった。一方で、postacrosomal のように胚による発現の影響がなくても、胚の有無で 2 週齢個体間でも発現量が異なる遺伝子があるため、胚自体ではなく産卵または脱皮周期の差が影響している可能性がある。よって第 4 章で実施した定量 PCR に用いるオオミジンコの 2 種齢個体のサンプルは、脱皮直後の個体のみを選定することで、胚による発現の影響だけでなく、2 週齢個体間の生物学的な周期を揃えることで、サンプル間のばらつきを抑えることにした。

また、今後の検討として、Athanasio et al. (2018) に示されている DNA メチル化阻害剤により DNA メチル化度が減少している遺伝子等に注目していくことで、DNA メチル化の影響が明らかになる可能性が考えられる。そこで、遺伝子発現量の上昇が確認できた遺伝子群については、バイサルファイトシーケンス手法により、具体的に塩基配列中へのメチル基の存在を確認していく必要があると考えられる。

第4章 網羅的な遺伝子発現解析に基づくオオミジンコ系統間の環境汚染化学物質に対する感受性の比較

4.1 研究目的と概要

オオミジンコやその近縁種の *Daphnia* 属を対象に、特定の化学物質に対する系統間の感受性差に着目した既存文献では、系統間の感受性差は特定遺伝子の発現量の差によって引き起こされていることが示唆されている。そこで第4章では、既存の研究アプローチとは逆に、系統間で発現量の異なる遺伝子に基づき、その遺伝子に関連する化学物質から、感受性に系統差を引き起こす化学物質を事前に把握することができると検証することを目的とした。

そのために、まずは第3章で実施したオオミジンコ3系統間の RNA-Seq により系統間で発現量が大きく異なっていた遺伝子群に対し、機能解析の1つ Gene Ontology enrichment 解析 (GO 解析) を実施することで、系統特異的な遺伝子群の生体的機能を推定した。次に、推定された生体機能の系統差を確認するため、キチン含有量やキチナーゼ活性の測定を行った。そして最後に、その機能を阻害する化学物質を用いて急性遊泳阻害試験を実施することにより、各系統で化学物質への感受性に差が生じるのかを検証した。

4.2 実験方法

4.2.1 Gene Ontology enrichment 解析

RNA-seq で得られた、系統間で発現量が異なる遺伝子群の生体機能を推定するために機能解析として使用される Gene Ontology enrichment 解析 (GO 解析) を実施した。GO 解析は、R software の GOseq ver. 1.44.0 (Young et al., 2021) にて行った。オオミジンコの遺伝子 ID には GO 解析で出力される GO term と必ずしも紐づけがされているわけではない。そこで、eggNOGmapper (v2) (Cantalapiedra et al., 2021) を用いて、オオミジンコを含む甲殻類の GO term 情報に NCBI から取得できるオオミジンコの全遺伝子のデータを紐づけることにより、GO 解析に必要なオオミジンコの遺伝子 ID と GO term が紐づいた基盤データを用意した。このデータを基に、本研究で実施した RNA-seq により発現が確認された全遺伝子に対して、系統間における発現変動遺伝子が属する割合の高い GO term を R software のパッケージの1つである GOseq により解析を実施した。検出された GO term の有意性については、FDR により導出される各 GO term の $p < 0.01$ を基準とした。

4.2.2 リアルタイム PCR (定量 PCR)

RNA-Seq で得られた、系統間における各遺伝子の発現傾向の精度の検証および異なる成長段階でも維持されるのかを検証するため、定量 PCR を第3章 3.2.8 に記載した方法と同様に実施した。サンプルとして、NIES 系統と England 系統を対象に、生後 24 時間未満の個体 (急性遊泳阻害試験に供した個体齢) と 2 週齢個体 (RNA-sequencing に供した個体齢) の 2 つの成長段階の個体を用いた。各成長段階のサンプルに用いる個体数は、生後 24 時間未満個体は 30 匹/サンプル、2 週齢個体は 5 匹/サンプルとして、各成長段階で 3 サンプルずつ用意した。第2章の定量 PCR のばらつき改善検討の結果から、2 週齢サンプルについては、2 週齢個体の育房中に含まれる胚による遺伝子発現量の影響を極力避けるため、脱皮直後の育房中に胚が含まれない個体を選んだ。なお、定量 PCR により得られた遺伝子発現量のサンプル間の正規化を行うために、18SrRNA をコントロール遺伝子として用いた。定量 PCR に用いた各遺伝子のプライマー情報を表 A-3 にまとめた。

4.2.3 キチン含有量の測定

キチンの測定は、Cauchie et al. (2002)を参考にした。用いるサンプルは2週齢個体とし、あらかじめ凍結乾燥した後に、乾燥重量を測定した。凍結乾燥したサンプルを0.5N-HClに6時間以上反応させることでサンプル中のミネラル分を除去して、遠心分離でHClを除去し、超純水で洗った。洗ったサンプルを100℃の0.5N-NaOHと反応させることで、サンプル中に含まれるタンパク質を除去した。NaOHに関しても、HClと同様に超純水による洗浄を行った。こうして精製されたサンプルに、キチン分解酵素であるYatalaseを1 mg, β -N-acetylglucosaminidaseを1 μ L, Bufferとして50 mM-sodium acetateを加えて、サンプル中のキチンをその単量体であるN-acetylglucosamineに分解した。分解されたN-acetylglucosamineをReissig et al. (1955)に倣って比色定量して、キチン量を見積もった。キチン量を乾燥重量で割ることにより、キチン含有率(chitin content/dry weight)を算出した。

4.2.4 キチナーゼ活性の測定

キチナーゼ活性の測定は、Qi et al. (2018)を参考にした。1サンプルには2週齢個体を5個体用いた。このサンプルを1.5 mlのphosphate-buffered saline中で破碎した後、遠心分離(10000 rpm, 30分, 2℃)し、その上澄み液をキチナーゼ活性の測定サンプルとして使用した。キチナーゼ活性の測定には、chitinase assay kit (Sigma-Aldrich)を用い、キットのプロトコルに従って、30分間のキチナーゼ活性を比色定量により測定した。また、サンプル間のキチナーゼ活性を正規化ためにサンプル中のタンパク質量の定量を行った。定量には、Bradford protein assay (Bio-Rad)を使用し、ウシ血清アルブミン由来のタンパク質をスタンダードとした検量線により定量した。サンプル中のキチナーゼ活性をタンパク質量で割ることで正規化した。キチナーゼ活性の単位は、Units mg-protein⁻¹ hour⁻¹ (Units: キチナーゼがキチンを分解することによって、1 μ LのN-acetylglucosamineが放出される量)に換算して表示した。

4.2.5 急性遊泳阻害試験

OECDのガイドライン No. 202 (OECD, 2004)に準拠して実施した。具体的には、対照区(Control区)および5つの濃度区に、生後24時間未満の仔虫を各20個体、1容器(50 mLビーカー)あたり5個体ずつ、4容器に分けて曝露した。急性遊泳阻害試験の試験条件を表4-1にまとめた。化学物質を48時間曝露した時点で、試験ビーカーを軽くゆすって15秒経っても、個体が遊泳できない場合、その個体は遊泳を阻害されたと判断した。化学物質に対する感受性の指標である48 h-EC₅₀の推定方法は、4.2.6の統計解析にまとめた。なお、試験精度の検証として、オオミジンコ3系統の二クロム酸カリウムに対する24 h-EC₅₀も求めた。各化学物質の曝露濃度を表4-2にまとめた。

表 4-1. 本研究で実施した急性遊泳阻害試験の試験条件

対象種・系統	<i>Daphnia magna</i> の NIES 系統と England 系統, Clone 5 系統
試験培地	M4 培地
供試個体数	20 個体 / 試験区 (5 個体 / 容器, 4 容器)
試験期間	48 時間
光条件	16L:8D
温度	20°C ± 2°C 以内
個体齢	生後 24 時間未満の個体
換水	なし
観察項目	遊泳阻害

表 4-2. 急性遊泳阻害試験に用いた各化学物質の曝露濃度

化学物質	CAS 番号	助剤 (DMF) の使用	濃度区					単位	
			Control	1	2	3	4		5
ジフルベンズロン	35367-38-5	有	0	0.1	0.3	1	3	10	μg/L
テフルベンズロン	83121-18-0	有	0	0.05	0.16	0.5	1.6	5	μg/L
20-ヒドロキシエクジソン	5289-74-7	有	0	0.6	0.9	1.5	2	3	mg/L
三酸化二ヒ素	1327-53-3	無	0	0.625	1.25	2.5	5	10	mg/L
カルタップ	15263-52-2	無	0	10	30	100	300	600	μg/L
イオノマイシン	56092-81-0	有	0	1	-	-	-	-	mg/L
ニクロム酸カリウム	7778-50-9	無	0	0.1	0.3	0.9	2.7	8.1	mg/L

4.2.6 統計解析

統計解析には, R software ver. 4.0.2 を用いた。急性遊泳阻害試験における EC₅₀ は, the drc package ver. 3.0-1 (Ritz et al., 2015) の 2 パラメータのロジスティック回帰を用いて, 設定濃度から推定した。体長や乾燥重量等の 3 系統の数値の比較には, Tukey's HSD の多重比較検定を用い, キチナーゼ活性等の 2 系統の比較には, Student's t-test により有意差を確認した。有意水準は 5%とした。

4.3 結果と考察

4.3.1 遺伝子発現情報をもとにした機能解析 (Gene Ontology enrichment)

第 2 章で実施した RNA-seq の結果をもとに, 系統間で発現量が大きく異なっていた遺伝子群の生体機能の特徴を把握することを目的として, 機能解析の 1 つである GO 解析を実施した。GO 解析は NIES 系統と England 系統の 2 系統を比較対象として, 発現量の比が NIES 系統で 2 倍以上高い遺伝子群をもとに実施した。図 4-1ABC に, NIES 系統で高発現していた遺伝子を対象とした GO 解析で出力される GO term を 3 種類に分類した結果を示した。図 4-1A の Molecular Function では, *chitin synthase*

activity のみが有意な ($p < 0.01$) 生体機能の情報 (GO term) として検出された。*chitin synthase activity* は、脱皮に必須とされるキチン代謝に関連する生体機能であることが分かっている。図 4-1B の Biological Process においても Molecular Function と同じく、*cell wall chitin metabolic process*, *cell wall chitin biosynthetic process*, *cuticle chitin metabolic process*, *cuticle chitin biosynthetic process*, and *chitin biosynthetic process* ($p < 0.01$) のように、キチン代謝に関する GO term が有意に検出された。また、図 4-1C の Cellular Component については、*cell septum* のみが有意に検出された ($p < 0.01$)。*cell septum* はペプチドグリカンやキチン等の物質からなる構造体とされ、その機能のすべてが明らかにされているわけではないが、細胞分裂時に娘細胞を区画化する役割を持つことが分かっている (The UniProt Consortium, 2021)。検出された 3 種類の GO term の中でも特に Molecular Function および Biological Process の結果では、England 系統と比較して NIES 系統で、キチン代謝に関連する遺伝子群の発現量が有意に高いことが判明した。よって、発現量だけでなくその生体機能にも違いがあることが予想した。

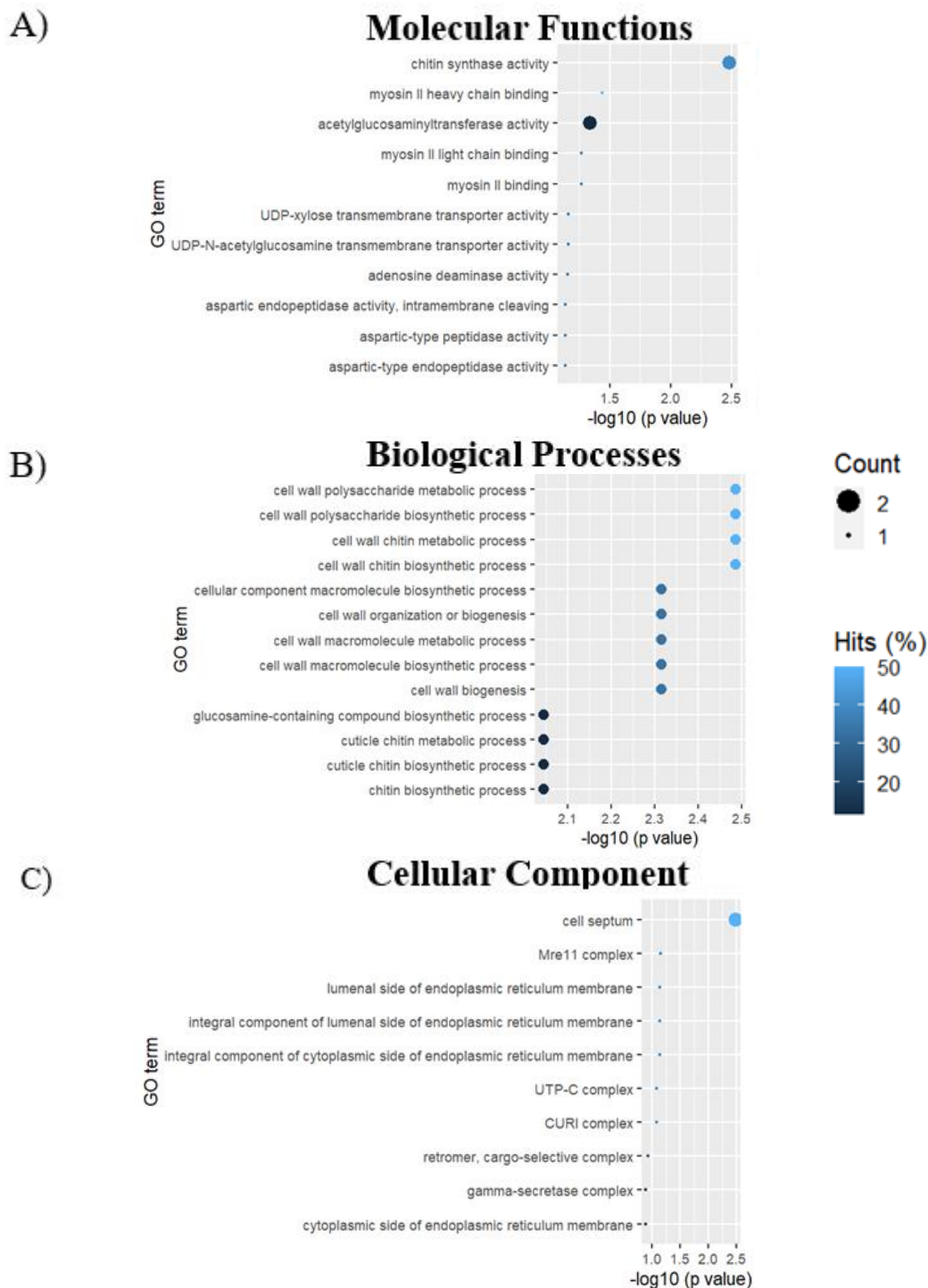


図 4-1. GO enrichment 解析の結果。England 系統と比べて NIES 系統で発現量が大きい(発現量比 2 倍以上)の発現変動遺伝子を対象に実施した。 $-\log_{10} p$ 値が 2.0 以上の GO term を有意な GO term とする。GO term は 3 種類に分類され、(A)は“Molecular Functions”，(B)は“Biological Process”，(C)は“Cellular Component”を示す。図中右側の“Count”は、GO term にアノテーションされた発現変動遺伝子の数を大きさで示し、“Hits”は各 GO term に属する遺伝子の総数に対する今回の解析でその GO term にアノテーションされた発現変動遺伝子の割合を%で示している。

4.3.2 定量 PCR による RNA-sequencing 結果の検証

RNA-seq により得られた遺伝子発現情報の精度を検証するため、定量 PCR を実施した。検証した項目は次に挙げる 2 つの項目である。

- ①各遺伝子における NIES 系統と England 系統の発現傾向の検証。
- ②RNA-Seq に供した 2 週齢個体と急性遊泳阻害試験に供した 24 時間未満齢で遺伝子発現傾向に差がないかを検証。

この 2 つの項目を検証するためにまず、NIES 系統と England 系統を比較した時に、発現比が 30 倍以上の遺伝子を 10 遺伝子選定した(表 4-3)。遺伝子を選定する際、RNA-seq で検出された遺伝子群の内、TMM 正規化(TMM の詳細な方法は第 3 章の遺伝子発現解析に記した)後の発現量が 1 に満たない遺伝子群は信頼性が低いため、解析の対象外とした。次に、この 10 遺伝子を定量 PCR するサンプルの個体齢として、RNA-seq を実施したサンプルの個体齢である 2 週齢と急性遊泳阻害試験に用いた個体齢である生後 24 時間未満個体の 2 つの成長段階のサンプルで検証することとした。

選定した 10 遺伝子の内、特異的な増幅ができるプライマーを作成できなかった *asialoglycoprotein receptor 1-like* を除く 9 遺伝子の定量 PCR の結果について、NIES 系統で高発現していた 4 遺伝子を図 4-2 に、England 系統で高発現していた 5 遺伝子を図 4-3 に示した。図 4-2 から、4 遺伝子のうち 3 遺伝子(*zinc metalloproteinase nas-8-like*, *chymotrypsin-1-like*, *chitin synthase CHS-2-like transcript variant X2 (CHS2LX2)*)について、図 4-3 から、5 遺伝子のうち 3 遺伝子(*alpha-(1, 3)-fucosyltransferase C-like*, *lactosylceramide 4-alpha-galactosyltransferase-like*, and *phytanoyl-CoA dioxygenase peroxisomal-like*)について、異なる成長段階においても系統間の発現傾向が RNA-Seq と一致した。一方で、他の 3 つの遺伝子(*zinc finger RNA-binding protein-like*, *DBH-like monooxygenase protein 2 homolog*, *carboxypeptidase B-like*)のうち、*zinc finger RNA-binding protein-like* は、2 週齢個体では RNA-seq と同じく、NIES 系統で高発現している傾向が確認できたが、生後 24 時間未満個体では 2 週齢とは逆に England 系統で高発現していた。また、本遺伝子の機能の 1 つとして胚発生時における原腸形成に関与することが示唆されており(The UniProt Consortium, 2021)、原腸形成時に発現量が上昇する可能性が高い。よって本遺伝子は、成長段階で発現量が大きく変化する遺伝子なのではないかと考えられる。*DBH-like monooxygenase protein 2 homolog* では、2 つの系統で発現量は同程度であった。*carboxypeptidase B-like* では、RNA-seq における発現傾向と逆転し、NIES 系統で発現量が高い傾向にあった。この 2 つの遺伝子では、いずれも生後 24 時間未満個体におけるサンプル間のばらつきが大きく、遺伝子機能が定かではないものの、生後 24 時間未満のような発生初期段階において発現量が短期的(数時間単位で)に変動しやすい遺伝子ではないかと考えられる。また、定量 PCR に用いた 2 つの成長段階のサンプルのうち、生後 24 時間未満のサンプルでは脱皮の周期を揃えることができないことも、2 週齢サンプルと比較して生後 24 時間未満サンプルでばらつきが大きくなった原因の 1 つではないかと考えられる。

表 4-3. RNA-seq の正規化済みリード数において, NIES 系統と England 系統で特に発現差の大きかった 10 遺伝子

遺伝子 ID	遺伝子名	遺伝子発現量 (リード数) ^a			発現比
		NIES	England	Clone 5	
LOC11692 0322	zinc metalloproteinase nas-8-like	655.38	9.81	1.43	66.83
LOC11692 2711	chymotrypsin-1-like	1791.79	27.19	74.29	65.90
LOC11693 4333	asialoglycoprotein receptor 1-like	55.61	1.16	1.53	47.97
LOC11692 3222	chitin synthase CHS-2-like transcript variant X2 (CHS2LX2)	38.06	1.24	0.94	30.78
LOC11693 6238	zinc finger RNA-binding protein-like	39.23	1.54	2.82	25.45
LOC11692 5711	DBH-like monooxygenase protein 2 homolog	41.36	1059.79	1515.65	0.04
LOC11692 6051	alpha-(1, 3)-fucosyltransferase C-like	1.73	50.99	38.21	0.03
LOC11692 6060	lactosylceramide 4-alpha-galactosyltransferase-like	1.13	52.27	39.20	0.02
LOC11692 0978	phytanoyl-CoA dioxygenase peroxisomal-like	1.34	64.29	84.53	0.02
LOC11692 8849	carboxypeptidase B-like	1.04	93.52	57.51	0.01

^a RNA-seq から得られた遺伝子発現量の生リード数を edgeR で正規化した後のリード数を表示。

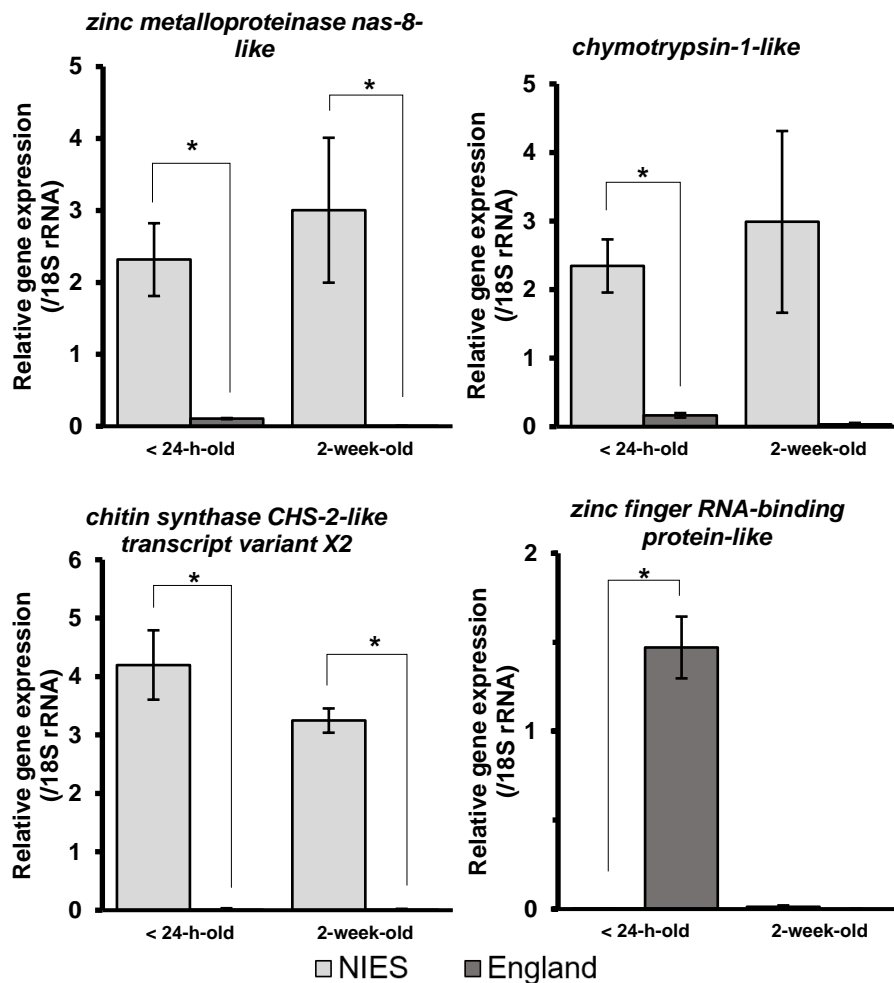


図 4-2. RNA-Seq において NIES 系統で高発現している 4 遺伝子を対象とした定量 PCR による発現量の結果。サンプルは NIES 系統と England 系統の 2 週齢および生後 24 時間未満の個体を使用 (Mean ± SE; n=3)。NIES 系統と England 系統の遺伝子発現量の統計学的有意差は Student's t-test により検定した (*: $p < 0.05$)。

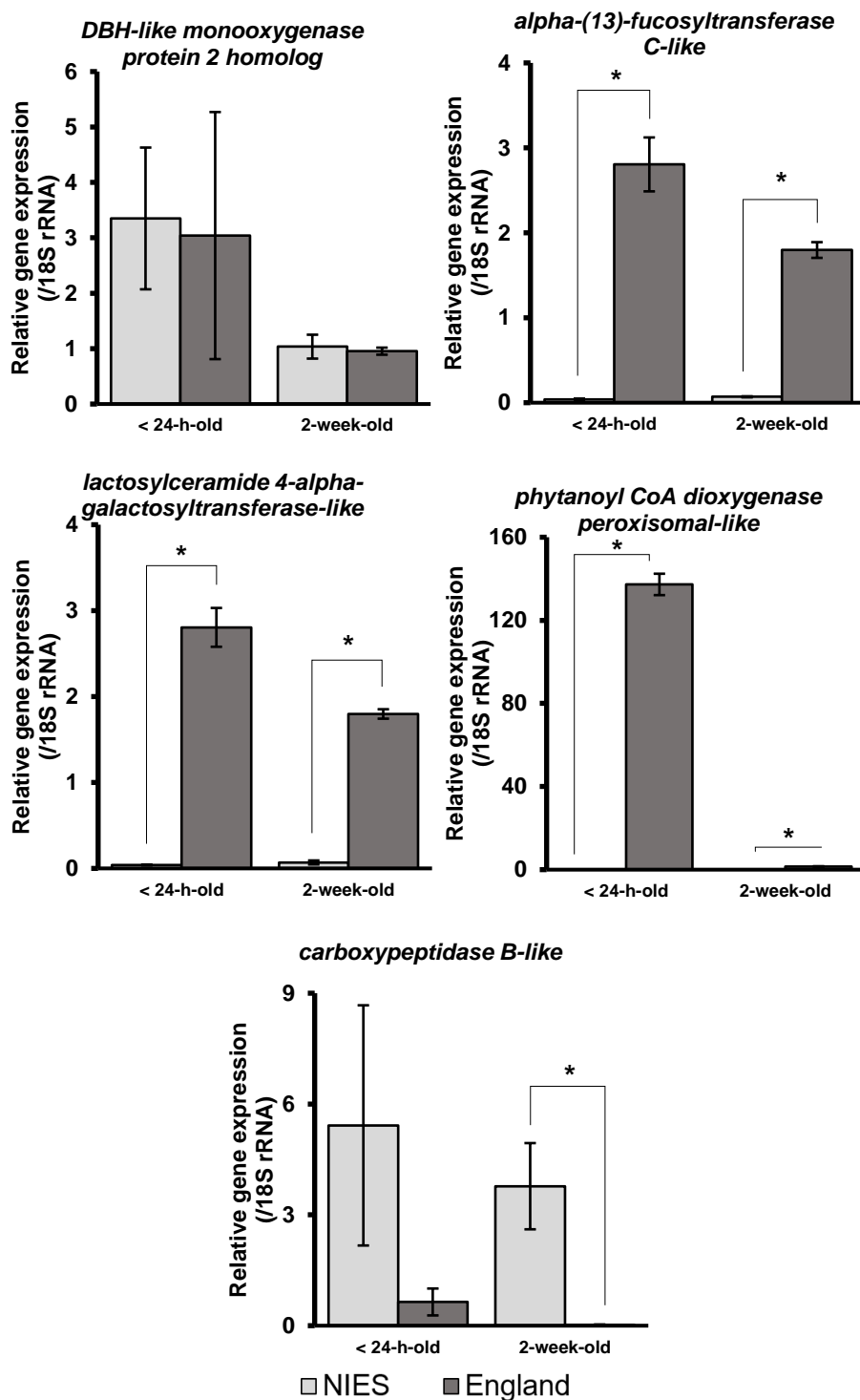


図 4-3. 表 4-3 の内, England 系統で高発現している 5 遺伝子を対象とした定量 PCR による発現量の結果。サンプルは NIES 系統と England 系統の 2 週齢および生後 24 時間未満の個体を使用 (Mean \pm SE; n=3)。NIES 系統と England 系統の遺伝子発現量の差を Student's t-test により検定した。*: $p < 0.05$ 。

定量 PCR により RNA-seq の結果が検証された 6 遺伝子の中でも, *CHS2LX2* はキチン合成酵素 (CHS) としてキチン代謝に関わることが昆虫等の他生物で示唆されており (Zhang et al., 2021), GO 解析で得られたキチン代謝に関する GO term の結果と一致

して、NIES 系統で発現量が高い結果が検証された。昆虫類では CHS に関して、作用対象の異なる 2 種類 (CHS-1 と CHS-2) の存在が確認されているが (Merzendorfer et al., 2003), オオミジンコで確認されているのは CHS-2 のみである。現在までに NCBI で公開されているオオミジンコの参照配列情報には、この CHS-2 には *CHS2LX2* 以外に、*CHS-2-like (CHS2L)*, *chitin synthase CHS-2-like transcript variant X1 (CHS2LX1)*, *chitin synthase CHS-2-like transcript variant X5 (CHS2LX5)* の計 4 つのアイソフォームが存在する。RNA-seq で得られた、これらのアイソフォームの遺伝子発現量を表 4-4 に示した。4 つのアイソフォームの内、*CHS2L* の発現量は 3 系統ともに最も大きく、キチン合成への寄与が大きいアイソフォームであることが予想されるが、発現量に大きな系統差はなかった。一方、*CHS2LX1* と *CHS2LX2* は、NIES 系統の発現量が他 2 系統と比較して高く、この発現量の違いが、キチン合成能力の違いを引き起こしている可能性がある。

表 4-4. RNA-sequencing でマッピングされた全 Chitin synthase-2 アイソフォームの遺伝子発現量

遺伝子名	相 同 性 a)	遺伝子発現量 (リード数)			NIES/England の発現比
		NIES	England	Clone 5	
chitin synthase like, transcript variant X2 (<i>CHS2LX2</i>)	chs-2- 100	38.06	1.24	0.94	30.78
chitin synthase like (<i>CHS2L</i>)	chs-2- 68.27	351.98	316.22	361.28	1.11
chitin synthase like, transcript variant X1 (<i>CHS2LX1</i>)	chs-2- 81.83	34.50	6.34	4.61	5.44
chitin synthase like, transcript variant X5 (<i>CHSLX5</i>)	chs-2- 65.79	7.75	15.31	12.46	0.51

a) 相同性は *CHS2LX2* の mRNA 配列と比較した結果を示している。

4.3.3 キチン代謝に関わる機能の測定

これらの CHS2 のアイソフォームは、キチン合成に関連することが多くの昆虫で判明しているが (Arakane et al., 2005; Cruz et al., 2000; Lu et al., 2019; Shi et al., 2016), オオミジンコにおいてもキチン合成に関与するのかは明らかになっていない。そのため、これらの遺伝子発現量の差が、キチン代謝の機能の差に反映されているかを調べるため、キチン代謝に関連する生体機能としてキチン含有量とキチナーゼ活性を各系統で測定した。

NIES 系統のキチン含有量は England 系統と比較して有意に高かった (図 4-4)。キチン含有量の系統差は、定量 PCR により検証された *CHS2LX2* の遺伝子発現量の違いと一致したことから、NIES 系統では *CHS2LX1* と *CHS2LX2* の高発現によりキチン合成能力が高く、キチン含有量も高くなったのではないかと考えられる。

脱皮時におけるキチン含有量には、キチンの合成と分解の 2 つの経路が関与しており、それぞれの経路を主に担うキチン合成酵素とキチン分解酵素のキチナーゼの 2 種類の酵素活性のバランスによりキチン含有量が決定する (Song et al., 2018)。そのため、2 種類の酵素活性の測定を試みたが、前者のキチン合成酵素の測定方法は開発段階

にあり(Zhang et al., 2013), 直接測定することは出来なかった。しかし, キチン含有量が NIES 系統で高いことから, その合成に必要なキチン合成活性も高いことが予想される。また, キチン合成活性は, 個体の成長や発達への関連性が示唆されているため(Zhang et al., 2021), 第 2 章の基礎データの取得で得られた, NIES 系統の方が体長や乾燥重量が大きい傾向(図 3-2)からも, NIES 系統でキチン合成活性が高いことを示唆している。

一方, 分解酵素のキチナーゼ活性は測定方法が確立しており, 市販のキットにより測定した結果, NIES 系統で高い活性を保有することが分かった(図 4-5)。キチナーゼが担うキチンの分解経路は, 脱皮に必須の経路の 1 つであり(Schmid et al., 2021), キチン含有量が多い分, 脱皮のためキチン分解活性も高い必要があると考えられる。このような理由から, NIES 系統ではキチン含有量が高いにも関わらず, キチン分解活性も高い結果となったと考えられる。

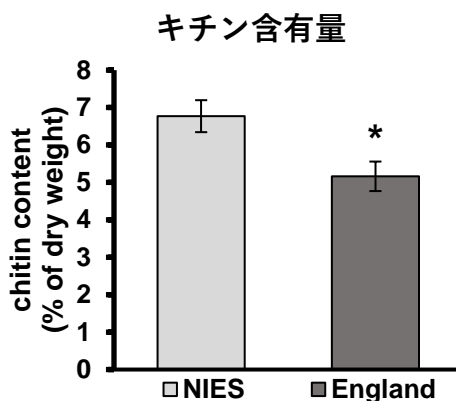


図 4-4. 乾燥重量当たりのキチン含有量 (Mean \pm SE; n=3)。サンプルは NIES 系統と England 系統の 2 週齢個体を用いた。*は系統間での統計学的有意差を示す (Student's-test, $p < 0.05$)。

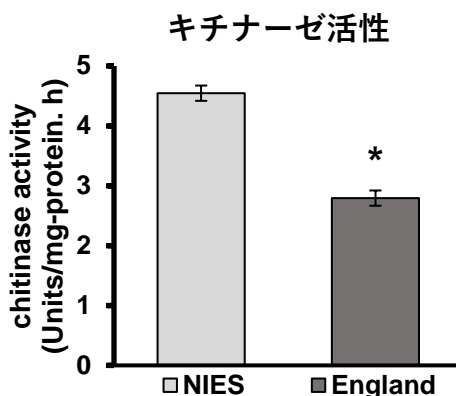


図 4-5. タンパク質量・1 時間当たりのキチナーゼ活性量 (Mean \pm SE; n=3)。サンプルは NIES 系統と England 系統の 2 週齢個体を用いた。**は系統間での統計学的有意差を示す (Student's-test, $p < 0.05$)。

4.3.4 急性遊泳阻害試験による系統間の感受性比較

これまでに得られた実験結果から、NIES 系統は England 系統と比較して、キチン合成酵素の遺伝子発現量だけでなく、キチン含有量も高いことが判明した。脱皮時の外殻形成には、一定量のキチン含有量が必要であり、個体のキチン含有量が低下すると、新しい外殻の形成がうまくいかず、不完全脱皮を誘発し、死に至ることが示唆されている(Song et al., 2018; Fotakis et al., 2020; Schmid et al., 2021)。生後 2 日未満のオオミジンコの個体の脱皮周期はおよそ 24 時間であり(Sumiya et al., 2016)、急性遊泳阻害試験の曝露時間の 48 時間に少なくとも 2 回は脱皮を行う。そのため、生後 24 時間未満(0 日齢)の個体に化学物質を 48 時間曝露する急性遊泳阻害試験において、キチン合成阻害剤に曝露した場合、キチン含有量の異なる NIES 系統と England 系統では、その感受性に違いが生じることが予想される。そこで、2 種類のキチン合成阻害剤、ジフルベンズロン(DFB)とテフルベンズロン(TFB)を用いて、急性遊泳阻害試験を実施することで、各系統の感受性に違いが生じるかを検証した(図 4-6)。その結果、DFB の 48 h-EC₅₀ の値に系統間で大きな差が生じた(表 4-5)。3 回試験して得られた 48 h-EC₅₀ の平均値で比べると、NIES 系統と England 系統の間で 14 倍以上、NIES 系統と Clone 5 系統の間では 7.6 倍以上の差が生じた。一方で、TFB の 48 h-EC₅₀ の値は、いずれの系統間でも系統差が 2 倍以内に収まった。DFB はキチン合成酵素を特異的に阻害することによりキチン合成を阻害することが判明している(Douris et al., 2016; Grigoraki et al., 2017)、一方 TFB では DFB と同じベンゾイルウレア系に属するキチン合成阻害剤に分類される農薬だが、キチン合成阻害における詳細な作用機序はいまだ明らかではない(Tassou et al., 2011)。そのため、DFB に比べて系統間の感受性差がかなり小さくなった明確な理由は分からないが、TFB はキチン合成阻害作用以外にも複数の作用があると指摘されている(Tassou et al., 2011)。具体的には、キチン合成に必須である UDP-N-アセチルグルコサミンの輸送の阻害やプロテアーゼの阻害作用が示唆されている(Miyamoto et al., 1993)。また、キチン合成阻害における作用機序についても、DFB とは異なり、キチン合成酵素を特異的に阻害するわけではないことが示唆されている(Gangishetti et al., 2009)。つまり、TFB はキチン合成阻害作用を有しているものの、キチン合成阻害作用以外の毒性(一般毒性)が DFB よりも大きいことが予想される。TFB の急性試験結果では、DFB と同じくキチン含有量の高い NIES 系統で感受性が低かったことから、TFB のキチン合成阻害作用により系統差が引き起こされたと考えられる。DFB と比べて系統差が小さかったのは、一般毒性の影響により、キチン合成阻害作用が弱くなったためと考えられる。

本研究ではキチン合成阻害剤以外にも、キチン代謝の上流制御機構を担う脱皮ホルモンとして 20-ヒドロキシエクジソン、神経系を阻害する化学物質として三酸化二ヒ素、ニコチン性アセチルコリン受容体のアンタゴニストとして中枢神経の阻害剤であるカルタップ、細胞内へのカルシウムイオンの流入を促進するイオノマイシンを対象に急性遊泳阻害試験を実施した。いずれの化学物質においても、系統間の 48 h-EC₅₀ の違いは 3 倍以内となり、大きな感受性の差は認められなかった。また、試験精度の検証に用いられる二クロム酸カリウム(OECD 2004; ISO6341, 2012)については、各系統の 24 h-EC₅₀ の値は許容範囲内(0.6–2.1 mg/L)に収まり、系統差も 2 倍以内となった。

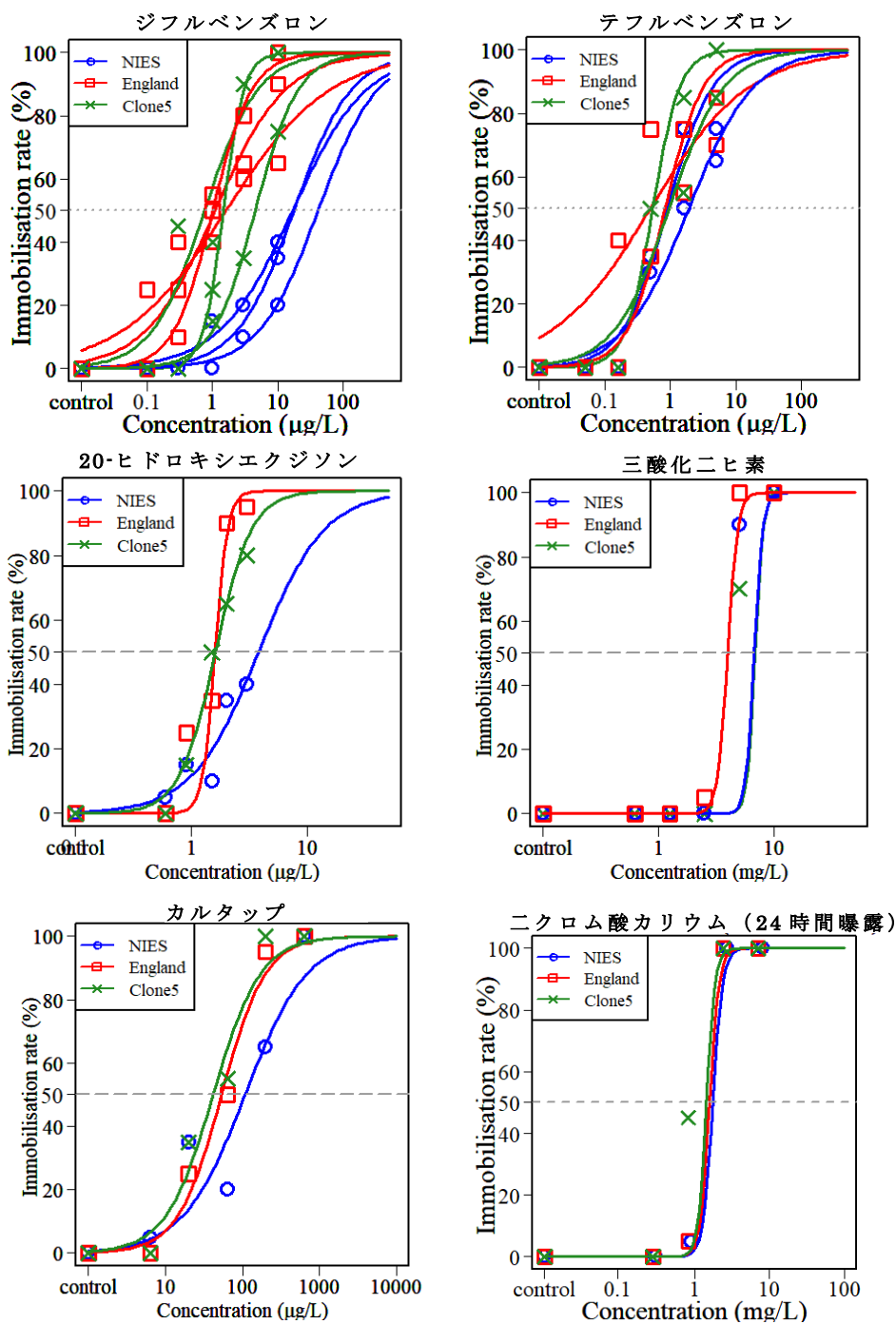


図 4-6. 各化学物質における急性遊泳阻害試験の濃度反応曲線(横軸は設定濃度, 縦軸は遊泳阻害率)。NIES 系統, England 系統, Clone 5 系統の 3 系統の結果をそれぞれ示した。グラフ中の点線は, 50%遊泳阻害率のラインを示している。ニクロム酸カリウムは急性遊泳阻害試験の試験精度の検証のために実施した。ジフルベンズロンやテフルベンズロンのように, 試験を複数回行った場合は, 各試験の濃度反応曲線を示した。

表 4-5. 各化学物質の急性遊泳阻害試験から算出された各系統の EC₅₀ のまとめ。

化学物質	48 h-EC ₅₀ ± Standard deviation			単位	EC ₅₀ の比 (NIES/England)	試験 回数
	NIES	England	Clone 5			
ジフルベ ンズロン	18.10±7.43	1.28±0.58 **	2.39±1.82 **	µg/L	14.16	3
テフルベ ンズロン	1.54±0.61	0.78±0.26	0.82±0.32	µg/L	1.98	2
20-ヒドロキ シエクジソ ン	3.83	1.43	1.66	mg/L	2.67	1
三酸化二 ヒ素	4.48	2.87	4.77	mg/L	1.56	1
カルタップ	87.24	50.50	39.90	µg/L	2.18	1
イオノマイ シン	毒性なし	毒性なし	毒性なし	Max conc.: 1 mg/L	—	1
二クロム酸 カリウム	1.11	1.08	0.92	mg/L	1.03	1

** : Tukey's HSD test, $p < 0.01$ 。

系統間で大きな感受性差が生じた DFB は、キチン合成酵素に直接的な阻害作用を持つことが判明しており (Douris et al., 2016; Grigoraki et al., 2017), キチン含有量を低下させることで不完全脱皮を誘発することが一部の甲殻類や昆虫で報告されている (Macken et al., 2015; Merzendorfer et al., 2012; Zhang et al., 2006)。図 4-4 および第 3 章の図 3-5 により、キチン含有量とキチナーゼ活性と関連性があると考えられる 2 つの遺伝子 (*CHS2LX2* と *chitinase 10 like*) について、DFB 曝露による発現量への影響を定量 PCR により確認した。ミジンコへの DFB 曝露濃度は、急性遊泳阻害試験を実施した際の最低濃度である 100 ng/L の 10 分の 1 である 10 ng/L と、その半数濃度の 5 ng/L の 2 濃度区とした。曝露濃度を低くした理由は、死亡個体では必然的に遺伝子発現量が低下するため、生存時の個体をサンプルとする必要があるためである。例えば、DFB に対する感受性の高い England 系統では急性遊泳阻害試験の最低濃度の 100 ng/L でも、5%の遊泳阻害の影響が見られたため、それよりもさらに低い濃度で曝露することで生存個体のサンプルを確保した。結果として NIES 系統と England 系統のどちらの系統においても、*CHS2LX2*, *chitinase 10 like* とともに、DFB 曝露による遺伝子発現量の有意な変化は見られなかった (図 4-7)。DFB はキチン合成阻害を引き起こすため、*CHS2LX2* の発現量が低下すると予想したが、結果として DFB を曝露しても遺伝子発現量に変化は見られなかった。DFB はキチン合成酵素の mRNA ではなく、

翻訳されたタンパク質に直接作用することが分かっている(Grigoraki et al., 2017)。そのため、DFBを曝露しても mRNA の量(発現量)に変化がみられなかったと考えられる。

遺伝子発現量に対する DFB の影響は観察されなかったものの、DFB を曝露した個体を顕微鏡観察したところ、遊泳阻害を引き起こした多くの個体で不完全脱皮を誘発していることが分かった(図 4-8)。Douris et al. (2016)では、蛾の 1 種である *Plutella xylostella* の幼齢個体のキチン合成酵素のノックアウトにより DFB への感受性が上昇することを示している。この先行研究と同じように、本研究で確認された DFB に対する感受性の系統差も、キチン合成酵素遺伝子の発現量の違いが主な原因であると考えられる。今後の課題として、DFB に対する感受性の系統差の原因をさらに解明していくには、DFB を曝露した時に発現変動する遺伝子を幅広く特定していく必要性や、オオミジンコで確立されている特定遺伝子のノックダウンやノックアウト手法を用いることにより *CHS2LX2* 等の感受性差の原因と疑われる遺伝子機能の欠損により、遺伝子発現量と感受性の関連性を証明していく必要がある。また DFB のように化学物質の作用対象が mRNA ではなく酵素の場合、キチン合成における遺伝子発現量だけでなく酵素活性も測定していく必要がある。

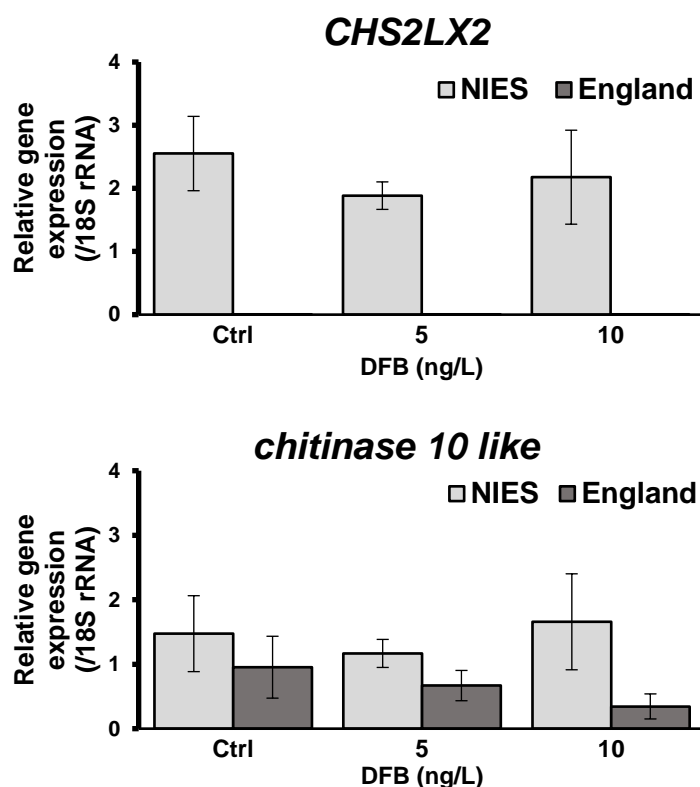


図 4-7. NIES 系統と England 系統における、DFB 曝露による *CHS2LX2* と *chitinase 10 like* 遺伝子発現量の変化。各系統で対照区(Control)と比べて DFB 曝露区の遺伝子発現量に有意差は示されなかった(Dunnett' test)。

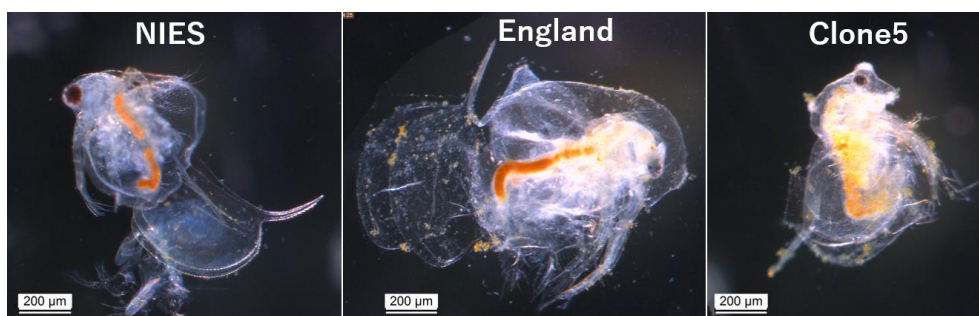


図 4-8.ジフルベンズロンで急性遊泳阻害試験終了時の脱皮阻害の写真。急性遊泳阻害試験を行ったときに、各系統の個体の内、遊泳阻害が起きている個体を用いて、顕微鏡にて撮影した。

第 5 章 結論

5.1 本研究のまとめ

本研究では、RNA-seq によって異なるオオミジンコの 3 系統の通常飼育環境下における網羅的な遺伝子発現情報を比較した。解析結果から得られた、系統間で遺伝子発現量が大きく異なっていた遺伝子群を対象に、以下の 2 つの検証を実施した。第一に、各系統における遺伝子発現量の違いに DNA メチル化による発現制御機構が関与している可能性を検証した。第二に、機能解析(本研究では GO 解析を実施した)により、系統間で異なる生体機能を推定し、その機能に関わる化学物質から感受性に系統差を引き起こす化学物質を把握できないか検証した。

まず、遺伝子発現量の系統差に対する DNA メチル化の影響評価では、RNA-seq の結果から遺伝子発現傾向が大きく異なっていた NIES 系統と England 系統を対象として、発現量の比が 10 倍以上異なり、かつ遺伝子プロモーター領域に CpG 領域を含む遺伝子を対象に、DNA メチル化阻害剤の曝露により遺伝子発現量が上昇するかを確認した。結果として、今回対象とした 10 遺伝子の中で、発現量が有意に上昇した遺伝子はなく、これらの遺伝子について DNA メチル化により遺伝子発現が制御されている可能性は示されなかった。オオミジンコは、ゲノム全体の DNA メチル化度が他の生物種よりもかなり低く、1.03–1.51%程度であることが明らかにされている (Kvist et al., 2018)。つまり、他生物種に比べ遺伝子配列中に付加しているメチル基が全体的に少ない可能性が高いため、DNA メチル化によって発現が制御されている遺伝子の数も他の生物種よりかなり少ないと考えられる。今後の課題として、オオミジンコにおける DNA メチル化による遺伝子発現制御を特定していくには、Athanasio et al. (2018) が明らかにしている、各遺伝子が CpG 領域を複数持っていて、なおかつ DNA メチル化度が高い遺伝子群などに着目していく必要がある。

次に、遺伝子発現量の系統差に基づく化学物質の感受性比較では、まず発現変動遺伝子の機能解析から、NIES 系統と England 系統では、キチン代謝に差があることが判明した。具体的には、キチン合成酵素遺伝子 *CHS2LX2* の発現量が NIES 系統で高いだけでなく、*CHS2LX2* 遺伝子産物のキチン合成酵素により合成される生体機能キチンの含有量や、脱皮時にキチンを分解するキチナーゼ活性がすべて NIES 系統で高いことが分かった。さらに、キチン合成阻害剤であるジフルベンズロン (DFB) を用いて急性遊泳阻害試験を行った結果、系統間の 48 h-EC₅₀ 値に 10

倍以上の差があり、キチン合成能の高い NIES 系統で感受性が低いことが判明した。しかし、同じキチン合成阻害剤のテフルベンズロン (TFB) では、系統間の感受性差がほとんど生じなかった。この原因については、TFB の詳細なメカニズムが分からないため、現状では原因を特定できていないが、TFB と DFB の作用の違いやキチン合成阻害作用の強さの違いが原因ではないかと考えられる。以上で得られた結果から、キチン合成のように、推定された生理学的機能が感受性比較に用いた遊泳阻害に与える影響が明らかになっており、なおかつ、その機能に作用する化学物質の詳細な作用メカニズムが判明している場合に限っては、遺伝子発現量の系統差から化学物質の感受性差を把握できる可能性が確認できた。今後の研究として、本研究で提案した系統間で感受性差を引き起こす化学物質を把握する手法が、どのような化学物質や、どのような生体機能に着目した場合に適用できるのかをより明確にしていく必要がある。そのためには、キチン合成酵素遺伝子 *CHS2LX2* が関与するキチン代謝以外にも、例えば IRAC の殺虫剤の分類表に挙げられている神経系等に関連する遺伝子群にも着目し、本研究手法の適用範囲を確認していく必要がある。

5.2 本研究成果の自然環境循環学分野への貢献と自然環境学における意義

本研究では、オオミジンコの系統ごとの化学物質の感受性の違いに着眼点を置いた研究を行った。系統間における化学物質の感受性の違いは、試験結果に違いを引き起こす原因であり、それによって化学物質の生態影響を過小評価または過大評価してしまう恐れがある。化学物質の生態影響を正しく評価するには、各化学物質の生態毒性試験結果のばらつきを小さくしていく必要がある。先行研究および本研究からも、異なる系統で試験結果が大きく異なることが示されたため、試験結果のばらつきを減らすには、生態毒性試験に用いるべき系統を推奨することが望ましい。しかし、本研究から得られた結果だけでは、オオミジンコについて特定の系統を推奨することは難しい。なぜならば、先行研究で明らかにされているように、化学物質の種類によって系統間の感受性の序列は変化するためである (Baird et al., 1990; 1991)。また、緑藻類で明らかにされているように、飼育条件の違いによりゲノム変異が蓄積し、さらには化学物質の感受性にも違いが生じる (Yamagishi et al., 2020)、といった現象がオオミジンコでも生じる可能性がある。オオミジンコの継代飼育には、試験機関ごとに入手可能な試験用水や実施可能な換水頻度などが異なるため、各試験機関で飼育条件を統一することは難しい。そのため、仮に世界各地の試験機関に同じ系統を配布しても、試験機関ごとの飼育条件の違いがあるため、完全に同じ系統として維持することは難しいと考えられる。

以上のことから、現状でできることとして、各試験機関で用いる系統の特徴を把握することが重要であると考えられる。具体的には、その系統がどのような作用メカニズムの化学物質に対する感受性が高いのか、もしくは低いのかを事前に把握するとともに、系統によって感受性が極端に異なる化学物質群における試験データの利用には注意する必要がある。このような系統ごとの特徴を把握する際に、本研究で提案する網羅的な遺伝子発現量を系統間で比較することは、幅広い

作用メカニズムの化学物質に対する感受性を把握するのに貢献すると期待される。

なお最後に、自然環境学専攻における理念として、「自然資源の持続的利用や、自然環境との共生を図った持続可能な社会の形成が問われる今日、自然環境の特性を知る」ことがあげられている。持続可能な社会の形成のためには、我々の快適な生活を支えている化学物質の野生生物への有害な影響という負の側面を正しく理解するとともに、継代・飼育の容易さや適度な感受性、節足動物など無脊椎動物のモデルとしての利用実績があるオオミジンコの生理・生態を正しく理解して利用を進めていく必要があり、その点でも本研究の成果が役立つものとする。

引用文献

- Abramoff, M. D., Magalhaes, P. J., & Ram, S. J. (2005). Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), 36–43.
- Alves, N., Neuparth, T., Barros, S., & Santos, M. M. (2021). The anti-lipidemic drug simvastatin modifies epigenetic biomarkers in the amphipod *Gammarus locusta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111849>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Specht, C. A., Tomoyasu, Y., Lorenzen, M. D., Kanost, M., & Beeman, R. W. (2005). The Tribolium chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Molecular Biology*, 14(5), 453–463. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00576.x>
- Asselman, J., De Coninck, D. I. M., Vandegheuchte, M. B., Jansen, M., Decaestecker, E., De Meester, L., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Janssen, C. R., & De Schampelaere, K. A. C. (2015). Global cytosine methylation in *Daphnia magna* depends on genotype, environment, and their interaction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(5), 1056–1061. <https://doi.org/10.1002/etc.2887>
- Athanasio, C. G., Sommer, U., Viant, M. R., Chipman, J. K., & Mirbahai, L. (2018). Use of 5-azacytidine in a proof-of-concept study to evaluate the impact of pre-natal and post-natal exposures, as well as within generation persistent DNA methylation changes in *Daphnia*. *Ecotoxicology*, 27(5), 556–568. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1927-3>
- Baird, D. J., & Barata, C. (1998). Variability in the Response of *Daphnia* Clones to Toxic Substances: Are Safety Margins Being Compromised? *Archives of Toxicology*, 20, 399–406. https://doi.org/10.1007/978-3-642-46856-8_35
- Baird, D. J., Barber, I., & Calow, P. (1990). Clonal Variation in General responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects. *Functional Ecology*, 4(3), 399–407. <https://doi.org/10.2307/2389602>
- Baird, D. J., Barber, I., Bradley, M., Soares, A. M. V. M., & Calow, P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21(3), 257–265. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(91\)90064-V](https://doi.org/10.1016/0147-6513(91)90064-V)
- Barata, C., Baird, D. J., & Soares, A. M. V. M. (2002). Determining genetic variability in the distribution of sensitivities to toxic stress among and within field populations of *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology*, 36(14), 3045–3049. <https://doi.org/10.1021/es0158556>
- Barata, C., Baird, D. J., Miñarro, A., & Soares, A. M. V. M. (2000). Do genotype responses always converge from lethal to nonlethal toxicant exposure levels? Hypothesis tested using clones of *Daphnia magna* straus. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(9), 2314–2322. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190922>
- Becker, D., Reydelet, Y., Lopez, J. A., Jackson, C., Colbourne, J. K., Hawat, S., Hippler, M., Zeis, B., & Paul, R. J. (2018). The transcriptomic and proteomic responses of *Daphnia pulex* to changes in temperature and food supply comprise

- environment-specific and clone-specific elements. *BMC Genomics*, 19(1), 1–30. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4742-6>
- Bekker, E. I., Karabanov, D. P., Galimov, Y. R., Haag, C. R., Neretina, T. V., & Kotov, A. A. (2018). Phylogeography of *Daphnia magna* straus (Crustacea: Cladocera) in Northern Eurasia: Evidence for a deep longitudinal split between mitochondrial lineages. *PLoS ONE*, 13(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194045>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., & Huerta-Cepas, J. (2021). eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *BioRxiv*, 5, 2021.06.03.446934. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.03.446934v2%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.03.446934v2.abstract>
- Cauchie, H. M., Jaspars-Versali, M. F., Hoffmann, L., & Thomé, J. P. (2002). Potential of using *Daphnia magna* (crustacea) developing in an aerated waste stabilisation pond as a commercial source of chitin. *Aquaculture*, 205(1–2), 103–117. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00674-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00674-3)
- Chaturvedi, A., Zhou, J., Raeymaekers, J. A. M., Czypionka, T., Orsini, L., Jackson, C. E., Spanier, K. I., Shaw, J. R., Colbourne, J. K., & De Meester, L. (2021). Extensive standing genetic variation from a small number of founders enables rapid adaptation in *Daphnia*. *Nature Communications*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24581-z>
- Chain, F. J. J., Finlayson, S., Crease, T., & Cristescu, M. (2019). Variation in transcriptional responses to copper exposure across *Daphnia pulex* lineages. *Aquatic Toxicology*, 210(October 2018), 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.016>
- Cruz, J. A., Garcia, R., Rodriguez-Orengo, J. F., & Rodriguez-Medina, J. R. (2000). Increased chitin synthesis in response to type II myosin deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology Research Communications*, 3(1), 20–25. <https://doi.org/10.1006/mcbr.2000.0180>
- Douris, V., Steinbach, D., Panteleri, R., Livadaras, I., Pickett, J. A., Van Leeuwen, T., Nauen, R., & Vontas, J. (2016). Resistance mutation conserved between insects and mites unravels the benzoylurea insecticide mode of action on chitin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(51), 14692–14697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618258113>
- Fields, P. D., Reisser, C., Dukic, M., Haag, C. R., & Ebert, D. (2015). Genes mirror geography in *Daphnia magna*. *Molecular Ecology*, 24(17), 4521–4536. <https://doi.org/10.1111/mec.13324>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), 294–299.

- Fotakis, E. A., Mastrantonio, V., Grigoraki, L., Porretta, D., Puggioli, A., Chaskopoulou, A., Osório, H., Weill, M., Bellini, R., Urbanelli, S., & Vontas, J. (2020). Identification and detection of a novel point mutation in the chitin synthase gene of *Culex pipiens* associated with diflubenzuron resistance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008284>
- Gangishetti U, Breitenbach S, Zander M, Saheb SK, Müller U, Schwarz H, Moussian B. Effects of benzoylphenylurea on chitin synthesis and orientation in the cuticle of the *Drosophila* larva. *Eur J Cell Biol*. 2009 Mar;88(3):167-80. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.09.002.
- Gardiner-Garden, M., & Frommer, M. (1987). CpG Islands in Vertebrate Genomes. *Molecular Biology*, 196(2), 261–282. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90689-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9)
- Grigoraki, L., Puggioli, A., Mavridis, K., Douris, V., Montanari, M., Bellini, R., & Vontas, J. (2017). Striking diflubenzuron resistance in *Culex pipiens*, the prime vector of West Nile Virus. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12103-1>
- Haap, T., & Köhler, H. R. (2009). Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced hsp70 baseline levels and induction. *Aquatic Toxicology*, 94(2), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.06.006>
- Hearn, J., Plenderleith, F., & Little, T. J. (2021). DNA methylation differs extensively between strains of the same geographical origin and changes with age in *Daphnia magna*. *Epigenetics and Chromatin*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13072-020-00379-z>
- Hiruta, C., Kakui, K., Tollefsen, K. E., & Iguchi, T. (2018). Targeted gene disruption by use of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes in the water flea *Daphnia pulex*. *Genes to Cells*, 23(6), 494–502. <https://doi.org/10.1111/gtc.12589>
- Hognon, C., Besancenot, V., Gruez, A., Grandemange, S., & Monari, A. (2019). Cooperative Effects of Cytosine Methylation on DNA Structure and Dynamics. *Journal of Physical Chemistry B*, 123(34), 7365–7371. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b05835>
- ISO 6341. (2012). INTERNATIONAL STANDARD Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. <https://www.sis.se/std-915426>
- Keith, N., Tucker, A. E., Jackson, C. E., Sung, W., Lledó, J. I. L., Schridder, D. R., Schaack, S., Dudycha, J. L., Ackerman, M., Younge, A. J., Shaw, J. R., & Lynch, M. (2016). High mutational rates of large-scale duplication and deletion in *Daphnia pulex*. *Genome Research*, 26(1), 60–69. <https://doi.org/10.1101/gr.191338.115>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907–915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Kvist, J., Athanásio, C. G., Pfrender, M. E., Brown, J. B., Colbourne, J. K., & Mirbahai, L. (2020). A comprehensive epigenomic analysis of phenotypically distinguishable, genetically identical female and male *Daphnia pulex*. *BMC Genomics*, 21(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6415-5>
- Kvist, J., Gonçalves Athanásio, C., Shams Solari, O., Brown, J. B., Colbourne, J. K., Pfrender, M. E., & Mirbahai, L. (2018). Pattern of DNA Methylation in

- Daphnia: Evolutionary Perspective. *Genome Biology and Evolution*, 10(8), 1988–2007. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy155>
- Latta, L. C., Weider, L. J., Colbourne, J. K., & Pfrender, M. E. (2012). The evolution of salinity tolerance in *Daphnia*: A functional genomics approach. *Ecology Letters*, 15(8), 794–802. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01799.x>
- Lindeman, L. C., Thaulow, J., Song, Y., Kamstra, J. H., Xie, L., Asselman, J., Aleström, P., & Tollefsen, K. E. (2019). Epigenetic, transcriptional and phenotypic responses in two generations of *Daphnia magna* exposed to the DNA methylation inhibitor 5-azacytidine. *Environmental Epigenetics*, 5(3), 1–12. <https://doi.org/10.1093/eep/dvz016>
- Lu, Z. J., Huang, Y. L., Yu, H. Z., Li, N. Y., Xie, Y. X., Zhang, Q., Zeng, X. D., Hu, H., Huang, A. J., Yi, L., & Su, H. N. (2019). Silencing of the chitin synthase gene is lethal to the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153734>
- Lyu, K., Gu, L., Wang, H., Zhu, X., Zhang, L., Sun, Y., Huang, Y., & Yang, Z. (2019). Transcriptomic analysis dissects the mechanistic insight into the *Daphnia* clonal variation in tolerance to toxic *Microcystis*. *Limnology and Oceanography*, 64(1), 272–283. <https://doi.org/10.1002/lno.11038>
- Macken, A., Lillicrap, A., & Langford, K. (2015). Benzoylurea pesticides used as veterinary medicines in aquaculture: Risks and developmental effects on nontarget crustaceans. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(7), 1533–1542. <https://doi.org/10.1002/etc.2920>
- Major, K. M., Weston, D. P., Lydy, M. J., Huff Hartz, K. E., Wellborn, G. A., Manny, A. R., & Poynton, H. C. (2020). The G119S ace-1 mutation confers adaptive organophosphate resistance in a nontarget amphipod. *Evolutionary Applications*, 13(4), 620–635. <https://doi.org/10.1111/eva.12888>
- Martínez-Jerónimo, F. (2012). Description of the individual growth of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) through the von Bertalanffy growth equation. Effect of photoperiod and temperature. *Limnology*, 13(1), 65–71. <https://doi.org/10.1007/s10201-011-0356-2>
- Medina, M. H., Correa, J. A., & Barata, C. (2007). Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere*, 67(11), 2105–2114. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.024>
- Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206(24), 4393–4412. <https://doi.org/10.1242/jeb.00709>
- Merzendorfer, H., Kim, H. S., Chaudhari, S. S., Kumari, M., Specht, C. A., Butcher, S., Brown, S. J., Robert Manak, J., Beeman, R. W., Kramer, K. J., & Muthukrishnan, S. (2012). Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(4), 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.12.008>
- Miyamoto, J., Hirano, M., Takimoto, Y., Hatakoshi, M., 1993. Insect growth regulators for pest control, with emphasis on juvenile hormone analogs: present

- status and future prospects. ACS Symp. Ser., ACS, Washington, DC., vol. 524, pp. 144–168.
- Nakanishi, T., Kato, Y., Matsuura, T., & Watanabe, H. (2014). CRISPR/Cas-mediated targeted mutagenesis in *Daphnia magna*. PLoS ONE, 9(5), e98363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098363>
- NCBI, Genome Data Viewer, NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/genome/?id=GCF_003990815.1
- OECD. (1997). General Distribution OECD / GD (97) 19 REPORT OF THE FINAL RING TEST OF THE *DAPHNIA MAGNA* REPRODUCTION TEST ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Assessment, 97. [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplay documentpdf/doclangue=en&cote=ocde/gd\(97\)19](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplay/documentpdf/doclangue=en&cote=ocde/gd(97)19)
- OECD. (2004). OECD guideline for testing of chemicals daphnia sp., Acute Inmmobilisation Test. 100(2), 327–341. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90486-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90486-2)
- Oda, S., Tatarazako, N., Dorgerloh, M., Johnson, R. D., Ole Kusk, K., Leverett, D., Marchini, S., Nakari, T., Williams, T., & Iguchi, T. (2007). Strain difference in sensitivity to 3,4-dichloroaniline and insect growth regulator, fenoxycarb, in *Daphnia magna*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 67(3), 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.12.010>
- Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H., Morita, M., & Iguchi, T. (2006). Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. Chemosphere, 63(9), 1477–1484. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.09.026>
- Orsini, L., Brown, J. B., Solari, O. S., Li, D., He, S., Stoiber, M. H., Spanier, K. I., Gilbert, D., Jansen, M., Rusch, D., Pfrender, M. E., Colbourne, J. K., Frilander, M. J., Kvist, J., Decaestecker, E., Schampelaere, K. A. C. De, & Meester, L. De. (2018). Early transcriptional response pathways in *Daphnia magna* are Coordinated in Networks of Crustacean Specific Genes. Molecular Ecology, 27(4), 886–897. <https://doi.org/10.1111/mec.14261>.
- Persoone, G., Baudo, R., Cotman, M., Blaise, C., Thompson, K. C., Moreira-Santos, M., Vollat, B., Törökne, A., & Han, T. (2009). Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test - Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, 393, 29. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009012>
- Qi, S., Liu, X., Zhu, L., Chen, X., & Wang, C. (2018). Racemic, R-, and S-tebuconazole altered chitinase and chitobiase activity of *Daphnia magna*. Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 53(3), 171–175. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1399245>
- Reissig, J. L., Storminger, J. L., & Leloir, L. F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. The Journal of Biological Chemistry, 217(2), 959–966. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)65959-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)65959-9)
- Religia, P., Nguyen, N. D., Nong, Q. D., Matsuura, T., Kato, Y., & Watanabe, H. (2020). Mutation of the Cytochrome P450 CYP360A8 Gene Increases Sensitivity to

- Paraquat in *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 40(5), 1279–1288. <https://doi.org/10.1002/etc.4970>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-response analysis using R. PLoS ONE, 10(12), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Schmid, S., Song, Y., & Tollefsen, K. E. (2021). Inhibition of Chitin Synthase 1 Leading to Increased Mortality in Arthropods. Environmental Toxicology and Chemistry, 40(8), 2112–2120. <https://doi.org/10.1002/etc.5058>
- Schumpert, C. A., Dudycha, J. L., & Patel, R. C. (2015). Development of an efficient RNA interference method by feeding for the microcrustacean *Daphnia*. BMC Biotechnology, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0209-x>
- Shi, J. F., Mu, L. L., Chen, X., Guo, W. C., & Li, G. Q. (2016). RNA interference of chitin synthase genes inhibits chitin biosynthesis and affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). International Journal of Biological Sciences, 12(11), 1319–1331. <https://doi.org/10.7150/ijbs.14464>
- Song Y, Villeneuve DL, Toyota K, Iguchi T, T. K. (2018). Ecdysone Receptor Agonism Leading to Lethal Molting Disruption in Arthropods: Review and Adverse Outcome Pathway. Environ Sci Technol, 51 (8), 4142–4157. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00480>
- Sumiya, E., Ogino, Y., Toyota, K., Miyakawa, H., Miyagawa, S., & Iguchi, T. (2016). Neverland regulates embryonic moltings through the regulation of ecdysteroid synthesis in the water flea *Daphnia magna*, and may thus act as a target for chemical disruption of molting. Journal of Applied Toxicology, 36(11), 1476–1485. <https://doi.org/10.1002/jat.3306>
- Tassou KT, Schulz R. Two-generation effects of the chitin synthesis inhibitor, teflubenzuron, on the aquatic midge *Chironomus riparius*. Ecotoxicol Environ Saf. 2011 Jul;74(5):1203-9. <http://10.1016/j.ecoenv.2011.02.013>.
- The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, Nucleic Acids Research, Volume 49, Issue D1, 8 January 2021, Pages D480–D489, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- Toumi, H., Boumaiza, M., Millet, M., Radetski, C. M., Camara, B. I., Felten, V., & Féraud, J. F. (2015). Investigation of differences in sensitivity between 3 strains of *Daphnia magna* (crustacean Cladocera) exposed to malathion (organophosphorous pesticide). Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 50(1), 34–44. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.965617>
- Toumi, H., Boumaiza, M., Millet, M., Radetski, C. M., Felten, V., Fouque, C., & Féraud, J. F. (2013). Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). Science of the Total Environment, 458–460, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.085>
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40(15):e115

- Vandeghechuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2014). Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764–765, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.08.008>
- Vandenbussche, I., Sass, A., Pinto-Carbó, M., Mannweiler, O., Eberl, L., & Coenye, T. (2020). DNA methylation epigenetically regulates gene expression in *Burkholderia cenocepacia*. *BioRxiv*, 5(4), 1–17.
- Wang, W., Zhang, K., Deng, D., Zhang, Y. N., Peng, S., & Xu, X. (2016). Genetic Diversity of *Daphnia pulex* in the Middle and Lower Reaches of the Yangtze River. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152436>
- Weston, D. P., Poynton, H. C., Wellborn, G. A., Lydy, M. J., Blalock, B. J., Sepulveda, M. S., & Colbourne, J. K. (2013). Multiple origins of pyrethroid insecticide resistance across the species complex of a nontarget aquatic crustacean, *Hyaella azteca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(41), 16532–16537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302023110>
- Whitehead, A., Clark, B. W., Reid, N. M., Hahn, M. E., & Nacci, D. (2017). When evolution is the solution to pollution: Key principles, and lessons from rapid repeated adaptation of killifish (*Fundulus heteroclitus*) populations. *Evolutionary Applications*, 10(8), 762–783. <https://doi.org/10.1111/eva.12470>
- Wu, Alexander T H, Peter Sutovsky, Wei Xu, Aarnoud C van der Spoel, Frances M. Platt and Richard Oko. “The postacrosomal assembly of sperm head protein, PAWP, is independent of acrosome formation and dependent on microtubular manchette transport.” *Developmental biology* 312 2 (2007): 471-83 .
- Yamagishi, T., Yamaguchi, H., Suzuki, S., Yoshikawa, M., Jameson, I., Lorenz, M., Nobles, D. R., Campbell, C., Seki, M., Kawachi, M., & Yamamoto, H. (2020). Comparative genome analysis of test algal strain NIVA-CHL1 (*Raphidocelis subcapitata*) maintained in microalgal culture collections worldwide. *PLoS ONE*, 15(11 November), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241889>
- Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., & Oshlack, A. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology*, 11(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r14>
- Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2006). Characterization of a chitin synthase cDNA and its increased mRNA level associated with decreased chitin synthesis in *Anopheles quadrimaculatus* exposed to diflubenzuron. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(9), 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.06.002>
- Zhang, X., & Yan Zhu, K. (2013). Biochemical characterization of chitin synthase activity and inhibition in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Science*, 20(2), 158–166. <https://doi.org/10.1111/j.1744-917.2012.01568>
- Zhang, X., Yuan, J., Li, F., & Xiang, J. (2021). Chitin Synthesis and Degradation in Crustaceans: A Genomic View and Application. *Marine Drugs*, 19(3), 1–23. <https://doi.org/10.3390/md1903015>

謝辞

本研究は、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 自然環境学専攻 自然環境循環学講座(国立環境研究所 生態毒性研究室)にて行われたものである。本研究を行うにあたり、多くの方々にご指導・ご協力頂きました。

指導教員の山本裕史教授には、研究室のゼミを通して研究方針や内容に関して、幅広い知識をもとに大変参考になる意見を多く頂き、学生である私たちが安心して研究に打ち込めるように様々な配慮をして頂きました。副指導教員の山岸隆博准教授には、研究室ゼミを通じて、生物学に関する大変参考になる意見を多く頂き、研究への理解が非常に深まりました。渡部春奈准教授には、研究を始めた当初から、実験の相談から研究結果の考察に至るまで非常に多くの時間を割いて頂き、解析に用いる統計学的手法など私の知らない知識を多く教えて頂いて、非常に勉強になりました。日置恭史郎研究員には、本研究の論文化に伴い、解析手法から論文化のテクニックまで非常に多くの知識を教えて頂きました。執筆の際にも執筆の仕方や構成の相談に乗って頂きました。2年間、研究面でも経済面でも、多くの支援を頂いた生態毒性研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。

岡村和幸研究員には、入学当初のピペットの使い方すら分からない状態から論文化に至るまで丁寧にご指導していただきました。実験が上手くいかないときも遅くまで一緒に考えて頂き、非常に心強かったです。同じく野原恵子先生にも、論文化に伴い非常に多くのテクニックをご教授頂きました。研究室にお邪魔する時も嫌な顔一つせず優しく対応して下さい、大変ありがたかったです。お二人は、別の研究室かつ研究分野が違っても関わらず、非常に親身になって相談に乗って頂き、お陰様で良いモチベーションを保って研究を進めることができました。研究はもちろん、教育理念や人とのかかわり方を多く学ばせて頂いた病態分子解析研究室の皆様には深く感謝いたします。

国立環境研究所では、研究活動以外にも蹴球同好会、バドミントン同好会に参加させて頂いたおかげで良い健康状態で研究を行うことができました。ありがとうございます。

そして、これまでの生活を支えて下さった両親に深く感謝致します。

Appendix

表 A-1. 定量 PCR に用いた各遺伝子のプライマー配列情報

遺伝子名	5' Primer (5'-3')	3' Primer (5'-3')
vacuolar protein sorting-associated protein 26C-like	TTCCACGGCTCTT TACTTGC	CCAGGTGGTTGTC TTCGAAC
chymotrypsin 1 like	AAACTACCCCAGG GACAGG	AACCCTTGGCATC CCCAAAA
mucin-5AC-like	ACAGACGGGCTAT AACGCTT	TGGGTTACGCAGG ATCTTGT
transmembrane protease serine 9-like	CATTCTGTTTCGCC TACTACGC	TTTGTCCAGGCCG TAAATGTG
prostaglandin G/H synthase 2-like	CATTCTGTTTCGCC TACTACGC	TTTGTCCAGGCCG TAAATGTG
postacrosomal sheath WW domain-binding protein-like	GTTTCGACGCTACT CCTTTCG	GGGCAGCGTAACC ATAAGTG
lactosylceramide 4-alpha-galactosyltransferase-like	AACGGTGTCATGG CTTTTCC	CAGGACCGAGGCT CATGTAT
glycine-rich protein 1-like	CTGTAGAAGCCAC CCAAACC	CGTTCACAACAGC TTGGACA
glucose dehydrogenase [FAD quinone] like	TAACCCCTTCCCT GTTTCCC	GTGTCTAGGTCAT TGGGGCT
prisilkin-39-like	AAGGGAACGAAA GCCAAAGG	GCTGATCCGCCAA TGTTTGA
ACTIN	GGTATGTGCAAGG CTGGATT	GGTGTGGTGCCAG ATCTTTT
GAPDH	GGGGACAGACGTT TCCTGTA	AAGGGGTCATTGA CAGCAAC

表 A-2. オオミジンコ 3 系統で実施した RNA-sequencing 結果の概要

Sample	Clone 5	Clone 5	Clone 5	England	England	England	NIES	NIES	NIES
Accession number	DRX29 7489	DRX29 7490	DRX29 7491	DRX29 7486	DRX29 7487	DRX29 7488	DRX29 7483	DRX29 7484	DRX29 7485
Total reads	43,337,228	50,367,670	49,081,394	63,963,624	56,162,664	52,868,624	62,844,094	53,213,450	58,162,494
Total Read Bases (bp)	4.37 G	5.08 G	4.96 G	6.46 G	5.67 G	5.34 G	6.35 G	5.37 G	5.87 G
GC 含有量 (%)	48.57	48.27	48.97	48.86	49.69	57.74	53.40	49.02	49.00
Uniquely aligned to genes (%)	63	63	63	64	60	22	37	59	60

表 A-3. 定量 PCR に用いた各遺伝子のプライマー情報のまとめ

遺伝子名	PCR 産物の配列長	PCR 増幅効率 (%)	5' Primer (5'-3')	3' Primer (5'-3')
18S rRNA	77	117.46	CGCTCTGAATC AAGGGTGTT	TGTCCGACCGTGA AGAGAGT
zinc metalloproteinase nas-8-like	122	120.02	CCTACGTCATCT CCAGCAGT	AATGTAGTCGCTT TGGGTGC
chymotrypsin-1-like	80	109.13	ACCAGGCTGCT CTTTTGTTG	ACCAGCCGTTAAA ATGTGGG
chitin synthase CHS-2-like	132	109.97	ACCCAGTGAGG ATCTGTTGG	ATCATGTGGTGGG CTTTCTC
transcript variant X2 zinc finger RNA-binding protein-like DBH-like	98	103.85	GTCCCTCGTTG TCAGGGTAG	TCAACATGTGCAA AACAGCAGTA
monooxygenase protein 2 homolog alpha-(1, 3)	150	127.25	ATGGCATCGAC TATCCCAGC	CCAGTTGAGGCGG AAATTACC
- fucosyltransferase C-like	150	120.02	CGACGTGACAT GAAGCGAAT	GCTGGCGTTCATG AAATTGC
lactosylceramide 4-alpha-galactosyltransferase-like	112	110.58	GGGCAGCAGTG TAATCCATG	CAAAGCTGGGCCG TTATGTC
phytanoyl-CoA dioxygenase peroxisomal-like	144	123.5	TTGAGGTTGTT GGGTGGACT	TGTCTGGGCGAAA TCAAACG
carboxypeptidase B-like	145	119.14	TGCCAGTAATG AACCCGAT	GCAGATCCTCCCT CATTCCA