

# 甲殻類（ミジンコ）におよぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究

研究者 渡邊 肇（岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター 助教授）

## 研究要旨

甲殻類は地球上の生物において大部分を占めているにもかかわらず、その知見は限られている。内分泌攪乱化学物質影響を生態系全体で捉えた場合、甲殻類への影響を考慮する必要があるが、甲殻類の内分泌系は脊椎動物とは大きく異なっており現在までの知見から類推することは困難である。本研究では、生態系においても重要な位置を占めているミジンコをモデルとしてその内分泌攪乱物質の評価と作用メカニズムを解明することを目的としている。この目的のために、ミジンコの化学物質に対する感受性を増殖試験を中心に解析すると同時に、ほとんど知見のなかったミジンコの遺伝子の解析を行った。

## 研究者協力者

鑑迫 典久（国立環境研究所 研究員）

勝 義直（岡崎国立共同研究機構 助手）

## A. 研究目的

地球上に生息する生物のうち95%が無脊椎動物と言われ、その中の大部分を甲殻類が占めていることから、甲殻類の研究とその保護は地球上の生命環境の維持と密接に結びついている。ところが、内分泌攪乱化学物質影響については、広範な生物種における影響が懸念されているにもかかわらず、甲殻類についてはほとんど研究がなされていないのが現状である。甲殻類の内分泌系は脊椎動物のそれと大きく異なることから、脊椎動物を対象としたリスク評価により影響が無いとされた化学物質が甲殻類において重篤な影響を及ぼし生態系を乱す可能性がある。従って、生態系全体を考慮した場合には脊椎動物に偏らない評価が必要であり、この点からも甲殻類を対象としたリスク評価系の確立とそのメカニズムの解明は急務である。特に水棲甲殻類の一つであるミジンコは食物連鎖の下位に位置することから、生態系全体を保護し環境を維持する観点から重要である。本研究では、ミジンコを用いた内分泌攪乱化学物質影響を評価する系を確立し、その作用メカニズムを遺伝子レベルから解明することを目的とする。

## B. 研究方法

環境省が選定した優先してリスク評価に取り組む化学物質などについて内分泌攪乱の作用を解明するために、ミジンコをモデル動物とし主に遺伝子からの影響評価と解析を行う。これにより、最終的に遺伝子レベルからの内分泌攪乱作用の作用メカニズムの解明を目指す。

す。

## 1. 遺伝子からのアプローチ

GenBank に登録されているオオミジンコ (*Daphnia magna*) の遺伝子のうち、タンパク質をコードしているものはわずかに 6 種類にすぎない。そこで、まずホルモンレセプターや代謝メカニズム解明のための基盤とするためにミジンコで発現している遺伝子情報の取得を行う。

具体的には、下記の手順によりダフニアマグナで発現している遺伝子の mRNA の情報 (Expressed Sequence Tag) EST を取得した。ダフニアマグナから mRNA を調整し、cDNA ライブラリーを作製する。ライブラリー作製には、cDNA の方向をそろえるために、ファージ由来の ZAP II をベクターとして用いた。昨年度は、それぞれのクローンの 5' 末端からの配列を解析したが、これら取得した塩基配列のクラスタリング解析を行い、重複して解析した遺伝子のグループ分けを行った (コンティグの作製)。その結果それぞれが独立していると思われるグループ (コンティグ) から、代表的なクローンを選択し、その 3' 末端からの塩基配列の解析を行った。これにより基本的には、昨年度得られた遺伝子の両末端の塩基配列を得られることになる。

具体的な方法としては、昨年度に作製した EST クローンのグリセロールストックより、選択したクローンをピックアップし、TempliPhi DNA Sequencing Template Amplification Kit (アマシャム社) を用いてシーケンス用 DNA テンプレートを調製した。これを鋳型として M13 プライマーを用いてによりダイターミネータ法により (DYEnamic ET dye terminator kit (アマシャム社)) 解析を行った。塩基配列の読み取りは、MegaBASE4000 (アマシャム社) を用いた。

シーケンスデータは Phred 値を計算し、Phred Quality 値が 15 以上の塩基配列について、さらに解析を行った。Phred 値は、配列解析結果の信頼性の指標となるものであり、低い値の場合得られた塩基配列情報の信頼性が低くなる。

解析した遺伝子情報から、発現している遺伝子の概要を把握するとともに、近縁種との遺伝子配列の比較を行うことにより、遺伝子レベルでの解明の基盤となるだけでなく、3' 末端の配列は DNA マイクロアレイ設計のために利用できる。これらの情報は、ダフニアマグナのホルモンレセプターの解析や内分泌攪乱化学物質による遺伝子発現変化の解析のための基礎的な情報として利用する。

## 2. マイクロアレイ解析

得られた遺伝子情報をもとに、相同性や GC 含量をもとにマイクロアレイ用の適切なオリゴヌクレオチドを設計する。これをガラスアレイ上に固定化することにより、DNA マイクロアレイを作製する。この DNA マイクロアレイを用いて、ミジンコから抽出した RNA をもとに作製したプローブをハイブリダイズさせ解析する。これにより、ミジンコにおける遺伝

子発現状態を DNA マイクロアレイを用いて評価することの妥当性について検証する。

ミジンコにおける化学物質の曝露については、内分泌攪乱影響評価を繁殖阻害試験にもとづいて行った。研究材料としては、塩基配列解析に用いたのと同じ、ダフニアマグナ (*Daphnia magna*) の系列を用いた。試験温度  $24 \pm 1$  または  $21 \pm 1$ 、 $1 \text{ pH}7 \pm 0.5$ 、半止水式、週 3 回換水の条件下で試験を行った。飼育水は活性炭でろ過したものを、100ml の容器に 80ml の水を用いて飼育した。水の硬度は 80mg/L、溶存酸素濃度は 80-90%であった。エサはクロレラを用い、一日当りおよそ  $2 \times 10^7$  のクロレラを与えた。曝露群については、発生後 24 時間以内から曝露を開始し、21 日間曝露した後に RNA を調整した。曝露には、生殖影響が知られているフェノキシカルブを 2ppb の濃度で用いた。

#### ミジンコからの total RNA の抽出・精製

DNA マイクロアレイを用いた解析を行うために、被験物質に一定時間曝露させたミジンコと未曝露のミジンコから total RNA の抽出、精製を行った。ミジンコを回収後、TRIzol (Invitrogen 社) 中でフィスコトロン (マイクロテック社) を用いてプロトコールに従い total RNA を回収した。これをさらに RNeasy (キアゲン社) を用いて再精製した。

ここで得られた total RNA の一部をとり、 $OD_{260}$  と  $OD_{280}$  を測定することにより、純度と濃度を評価した  $OD_{260/280}$  の比が、1.8 以上の total RNA を DNA マイクロアレイ解析に使用した。また、これと並行して RNA6000 Nano LabChip キットを用いて total RNA を解析する事によりリボソーマル RNA の定量を行い、調整した RNA が分解がしていないことを確認した。

#### ハイブリダイゼーション用プローブの調製

精製した total RNA から T7 プロモーターを融合した cDNA を合成し、T7RNA ポリメラーゼにより蛍光ラベルした cRNA プローブを合成した。この方法により RNA 量を数十倍から数百倍に増幅できる。この一連の反応については、基本的にアジレント社の Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (アジレント社) を用いた。

#### T7-based RNA 増幅

ミジンコから抽出、精製した total RNA 1 $\mu$ g に T7 プロモータ配列を付加した oligo(dT) プライマーを加え、65 で 10 分間熱処理した後に氷上で急冷した。その後、5 $\times$ M-MLV buffer、dNTP mixture、Ribonuclease inhibitor、Reverse Transcriptase M-MLV を加えて 20 $\mu$ L とした後、40 で 2 時間の反応を行い cDNA を合成した。

合成した cDNA 溶液に 4 $\times$ Transcription buffer, DTT, NTP, PEG, RNaseOUT, Inorganic Pyrophosphatase, T7 RNA polymerase, Cyanine3-CTP Cyanine5-CTP を加え全量を 80 $\mu$ l とし 40 で 2 時間インキュベートした。反応後、RNeasy で cRNA を精製した後に断片化しハイブリダイゼーションに用いた。

## DNA マイクロアレイのハイブリダイゼーションおよび洗浄

Cy3、Cy5 でラベルされたそれぞれの RNA を 90 10 分間加熱し熱変性を行った後、両者を混合し、ハイブリダイゼーション溶液 (6xSSC、0.1%SDS、10% Denhardt's Solution、10% Formamide) と混合し DNA マイクロアレイ上でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは 42 °C で 16-20 時間行った。ハイブリダイゼーション終了後、カバーガラスを 2×SSC 溶液中で静かにはがし、2×SSC / 0.2% SDS 溶液中で 55 °C、5 分間の洗浄を 2 回、続いて 2×SSC / 0.2% SDS 溶液中で 65 °C、5 分間の洗浄を行った。そして、0.05×SSC 溶液中でリンスを行い、遠心 (1000 rpm、3 分間) により DNA マイクロアレイを乾燥させた。この DNA マイクロアレイを GenePix4000B Scanner (Axon 社) を用いてアレイ上の Cy3、Cy5 それぞれの蛍光強度を測定した。

GenePix4000B Scanner を用いて得られた 2 種類の画像 (Cy3 画像、Cy5 画像) を GenePixPro (Axon 社) により解析し、各遺伝子スポットの蛍光シグナル強度を数値化した。数値化には、蛍光強度の中央値からバックグラウンド値を引いたものを用いた。遺伝子発現レベルの比率を算出するための標準化 (normalization) に際しては、各スポットの蛍光強度比の中央値を 1 に換算する global normalization 法を適用した。換算後、各遺伝子の Cy3 と Cy5 のシグナル値の比率を算出した。

## C. 研究結果

### 1. ミジンコの遺伝子情報の取得

従来の遺伝子情報が極端に少ないことから、昨年度はまずライブラリーから任意に選択したクローンの遺伝子配列を解析することにより、ダフニアマグナに関する遺伝子情報を取得した。昨年度には 5 2 1 2 クローンについて 5' 末端からの塩基配列を解読したが、さらに 5' 末端からの解析をすすめた。その結果およそ 8000 クローンについて、その 5' 末端からの塩基配列情報を取得できたが、これらの配列をクラスタリングにより整理し、独立と思われるクローン (遺伝子) 約 3159 クローンの 3' 末端の塩基配列の解析を行った。その結果、Phred 値を元に、2417 クローンの 3' 末端塩基配列を取得した。

また、これら一連の解析により得られた 5' 末端、3' 末端からの塩基配列とそのコンティグ解析、相同性検索の結果等については、Web 上にサイトを作り、Web 上でデータベースを閲覧できるようにした。

アドレスは、<http://ori.nibb.ac.jp:8093/> である。

図 1 にその代表的な画面を示す。これらのデータは、GeneBank に登録予定である。

なお、こうした多量の一連の解析に関しては、ライブラリーを作製する際に生じる実験的なアーティファクト、配列解析における不確定さが生じうるために、得られた配列の信頼性の検証を進めている。

### 2. マイクロアレイ化

DNA マイクロアレイの作製に当たっては、コストや時間がかかることから、まず遺伝子数

を絞り、プロトタイプのマイクロアレイを作製し、アレイの基盤、DNAの固定化法やプローブの調整法などの妥当性を検証することとした。

塩基配列の Blast 結果から、データベース上に類似配列が見つかった遺伝子を中心として、まず 176 遺伝子を選択した。遺伝子のリストを表 1 にまとめた。

遺伝子情報解析により得られた 3' 末端の塩基配列情報をもとにロングオリゴ DNA を合成し、ガラススライド上にスポットしたテストアレイを作製した。合成した DNA オリゴマーの長さは 60mer で、既に昨年度取得した *Daphnia* の EST 配列などと比較することにより、特異的な配列を選択した。

合成したロングオリゴは、表面をダイヤモンド処理したガラスアレイ（東洋鋼鈹）上にインクジェット方式を用いることによりプリントし（日本ガイシ）固定化した（図 2）。

### 3. マイクロアレイの評価

作製した DNA マイクロアレイを評価するために、まず同一試料を用いて、2 色蛍光の解析を行い評価を行った。図 4 に示したように、両者の相関は非常に高く（0.97~0.99）、色素を交換した反応においても、高い相関を示した（図 4）ことから、DNA マイクロアレイの基盤、スポット方法、試料の調整方法や解析方法においては、問題がないことがわかった。通常のスライドガラスタイプの DNA マイクロアレイでは不可能とされているアレイ間の蛍光強度の比較においても、比較的高い相関を示した（図 5）ことから、本研究で作製した DNA マイクロアレイは非常に再現性が高い系を構築できたことになる。

さらに遺伝子発現変化が適切に解析できるかを検討するために、幼若ミジンコ（発生後 48 時間以内）と成長したミジンコのそれぞれから RNA を調製し、遺伝子発現変化の解析を行った。この結果を図 6 に示したが、遺伝子発現変化が見られた遺伝子については、色素を交換しても基本的にその変化を検出できたことから、色素のとりこみによる誤差は極力おさえられているものと考えられた。また、発現が変化している遺伝子（表 3）について解析したところ、卵に必要なピテロジェニン遺伝子などは成長したミジンコに多く検出された。これは、ミジンコの生殖能の差を反映しているものと思われ、成熟度をマイクロアレイで検出できることが示唆された。

またマイクロアレイにより算出された倍率変化は、色素交換した場合にも検出されていることから、本研究課題で作製した DNA マイクロアレイはミジンコにおける遺伝子発現変化の検出に利用可能であることが示された。

### 4. DNA マイクロアレイに用いる塩基配列の影響

DNA マイクロアレイに用いるオリゴ DNA の塩基配列をどの様を選択するかは、そのアレイの特性を決める上で重要な要因である。本研究では、比較的発現量が多いヘモグロビン遺伝子をモデルとして、3 種類のオリゴ DNA を設計しアレイに搭載しその倍率変化を調べた。表に示したように、算出された倍率変化については、数値の差はみられるものの大きな差

は見られなかった。これは、3種類のヘモグロビンのオリゴ DNA が適切に設計されていることを示唆しているが、今後定量 PCR などを含めた詳細な検証が必要である。

- 7.43739 hemoglobin - Daphnia magna>gp:AB021134\_1 [AB021134] gi:4589706 (oligoA)
- 6.57621 hemoglobin - Daphnia magna>gp:AB021134\_3 [AB021134] gi:4589708 (oligoB)
- 6.30321 hemoglobin - Daphnia magna>gp:AB021134\_3 [AB021134] gi:4589708 (oligoC)

## 5. 生殖毒性との比較

以上の結果をふまえて、実際に内分泌攪乱作用が疑われる化学物質について、DNA マイクロアレイでその遺伝子発現に及ぼす影響を検出できるかについて検討を行った。ほ

本研究では、昆虫における幼若ホルモンのアナログであるフェノキシカルブを用いて解析を行った。用いた 2ppb という濃度は、成虫自体にはほとんど影響がないものの、産子数が未処理の 10 パーセント程度にまで落ち込み、ほとんどがオスになる条件である（図 7 左下参照）。

この条件で飼育したミジンコから RNA を調製し DNA マイクロアレイを用いて解析した結果を図 7 に示した。実際に曝露により、遺伝子発現に変動がみられる遺伝子を検出することができた。倍率変化とその遺伝子の blast 検索の結果を表 3 にまとめた。今後、再現性や用量依存性などについて検討を加え、より確実な検出を可能にしていく必要がある。

## D. 考察

### EST 解析結果

ミジンコの総遺伝子数については未知であるが、今回の解析により一定量の遺伝子情報が取得できた。クローンされた遺伝子の両末端の塩基配列を解読することにより、タンパク質をコードしている領域の配列と、DNA マイクロアレイ解析に有用な 3' 末端の配列を結びつけることができた。これにより、DNA マイクロアレイで重要な DNA オリゴマーの設計の基盤ができた。

また EST 配列のクラスタリング解析により、ミジンコにおいて、多く発現している遺伝子に関しても情報を取得することができた。今回の EST 解析は、遺伝子の発現頻度の評価もかねているために、ライブラリー作製にあたってノーマライズなどの操作を行わなかったが、ミジンコ全体で発現量が多い遺伝子などについても情報を得ることができた。特に ATP 合成に関連した遺伝子の発現が非常に多い事が明らかになった。また、ピテロゲニンやヘモグロビンなど、すでに報告のある遺伝子についても、発現量が非常に高いことが推察された。

### アレイ解析結果

これらの情報をもとに 176 遺伝子を選択し、DNA マイクロアレイのプロトタイプを作製し

た。いままで、ミジンコを用いた DNA マイクロアレイに関する報告はなかったために、まずプロトタイプを作製し、化学物質曝露による遺伝子発現変化を解析できるかについて検討することとした。

図3にマイクロアレイのスキャン画像の例を示したが、バックグラウンドの蛍光が低く、蛍光シグナルを明るくとらえることが可能になった。Cy3とCy5を交換して反応を行った場合、比較的良好に相関する(図3)ことから、RNAのラベリングから解析に至るまでのプロセスについては問題ないことが示された。

未処理のミジンコについて、2つのロットを用意し、それぞれCy3, Cy5でラベルして解析した場合、2つの実験間でばらつきが少ない事がわかった。このことから、ミジンコから比較的安定して、RNAを調製でき、解析を行う事が可能であることが示された。

またアレイ解析する際にステージを変え、ミジンコを幼若なミジンコと成虫のミジンコについて比較した場合、ピテロゲニンなどいくつかの遺伝子の発現状態が異なっている事が示された。ピテロゲニンは卵に蓄えられるタンパク質であり、幼若なミジンコで発現していないことが推察される。従って、このことから、DNA マイクロアレイのシステムが、期待通り機能していることが示された。また、同時に、DNA マイクロアレイ解析において、解析時のステージなどにも注意を払う必要性を示している。

このように機能する事が示された DNA マイクロアレイを用いて、実際に化学物質曝露を行ったミジンコについて、RNAを抽出し解析を行った。

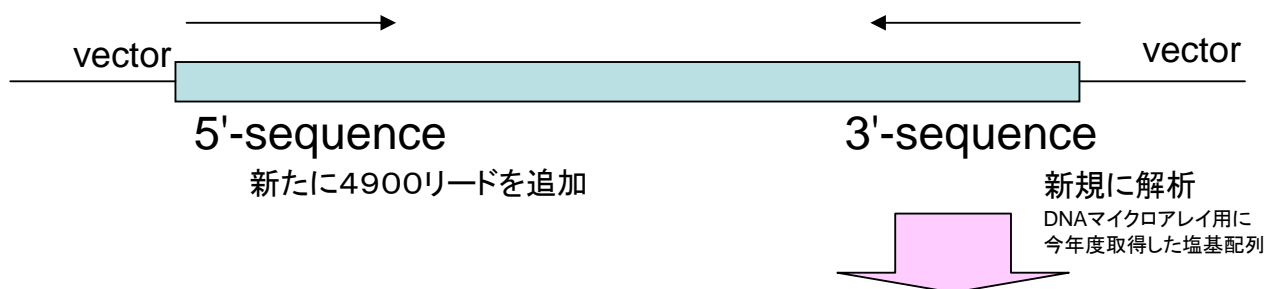
図7に示すように、未処理と処理で遺伝子発現の変動が見られた。変動が大きく見られた遺伝子についてのリストを表3にまとめたが、ヘモグロビンが大きく変動していることが示された。また発現が減少する遺伝子についても ARNT(Ah receptor nuclear translocator)などが変化することがわかった。

昨年度のハイスループット型のディファレンシャルディスプレイを用いた解析から、フェノキシカルブ曝露により、遺伝子発現が変動していることが推察されていたが、実際に DNA マイクロアレイ解析を行うことにより簡便に遺伝子発現変化を検出できることが確認できた。

今回の研究では、プロトタイプのマイクロアレイを評価する目的で遺伝子数を絞り込んだ解析を行ったため、発現変動が確認できた遺伝子数が限られていた。今後遺伝子数を増やし、網羅的に遺伝子発現の変化をとらえる必要がある。これにより、種々の化学物質曝露に対するマーカーとなる遺伝子の探索、曝露評価系の構築などが可能になると思われる。

図1

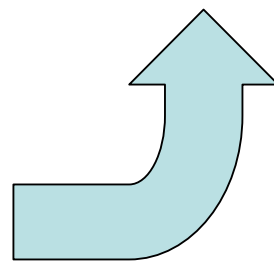
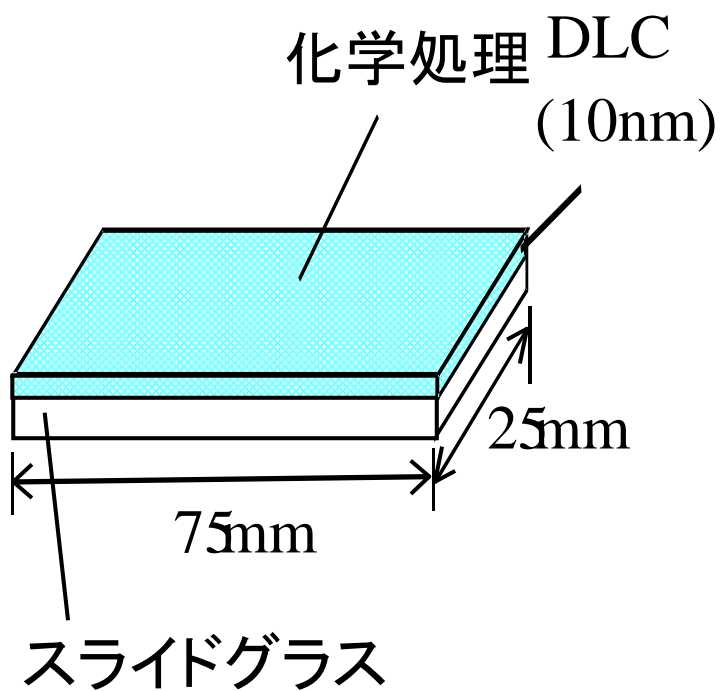
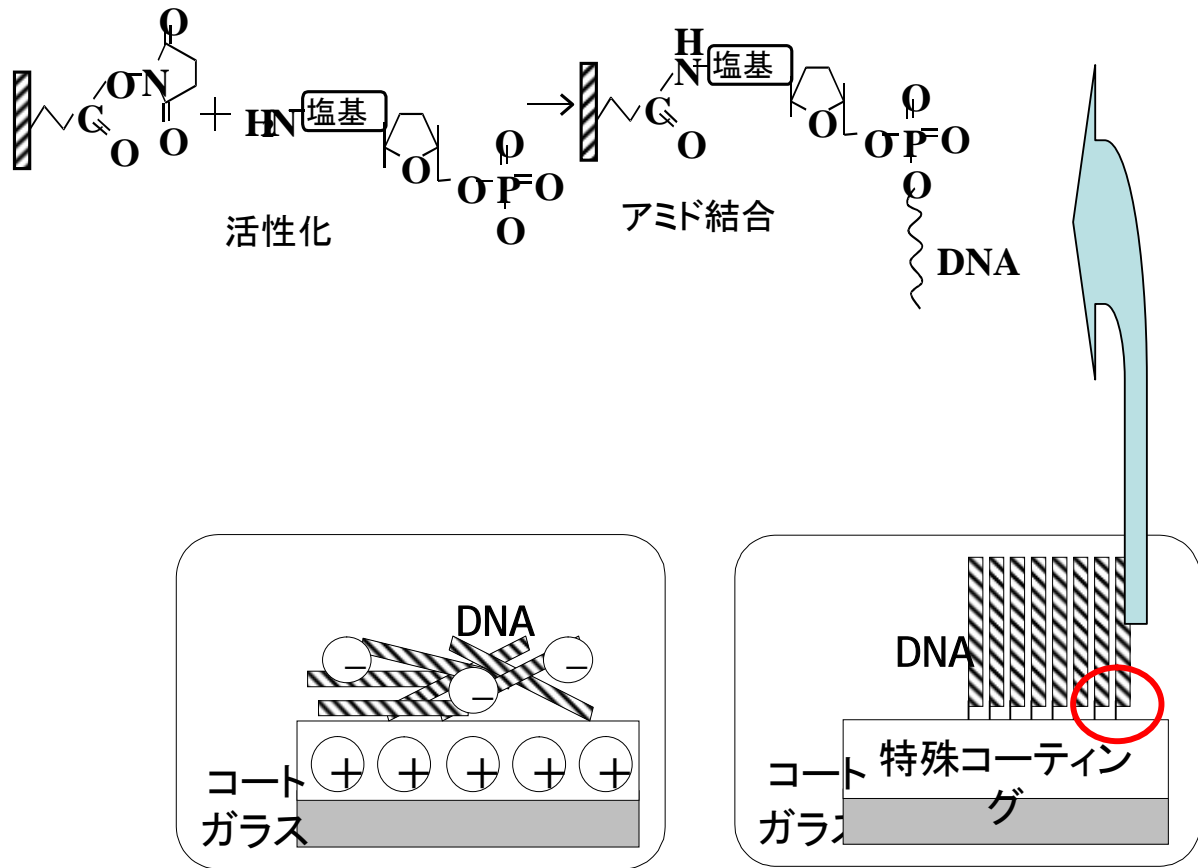
取得した遺伝子3'塩基配列情報のBlastサーチ結果(部分)



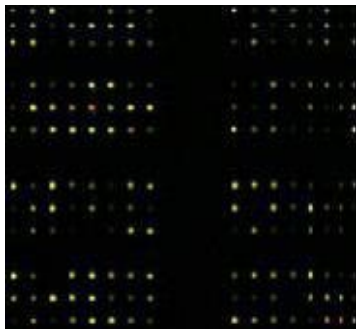
clone	5'-sequence				3'-sequence			
	length	BestHit	Eval ue	description	lengt h	BestHit	Ev alu e	description
<a href="#">WTH001_0005_A07</a>	482	<a href="#">sp:R10A_SPQFR</a>	2e-56	60S ribosomal protein L10a.>gp:AF391092_1 [AF391092] gi:14994666 ribosomal prot	551	<a href="#">sp:R10A_SPOFR</a>	4e-65	60S ribosomal protein L10a.>gp:AF391092_1 [AF391092] gi:14994666 ribosomal prot
<a href="#">WTH001_0005_A08</a>	675	<a href="#">gpcu:B055147_1</a>	4e-35	[BC055147] gi:32766329 Unknown (protein for MGC:63583) [Danio rerio]	568	<a href="#">pir:B71445</a>	2e-25	probable glycerol-3-phosphate permease - Arabidopsis thaliana>prf:2405340RK
<a href="#">WTH001_0005_A09</a>	660	<a href="#">gp:AF359386_1</a>	5e-25	[AF359386] gi:13751870 pancreatic lipase-related protein type 2 precursor [Equus]	534	<a href="#">gp:AE003805_38</a>	8e-16	[AE003805] gi:7302862 CG6472-PA [Drosophila melanogaster]
<a href="#">WTH001_0005_A11</a>	652	<a href="#">gp:AF123591_1</a>	1e-38	[AF123591] gi:4567054 fertilization envelope outer layer protein [Cyprinus carp]	689	<a href="#">sp:HGDROME</a>	4e-78	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5) (Homogentisicase) (Homogentisate ox
<a href="#">WTH001_0005_A14</a>	593	<a href="#">gpcu:B046709_1</a>	6e-40	[BC046709] gi:28302354 stip1-prov protein [Xenopus laevis]	590	<a href="#">gp:AE003590_70</a>	7e-65	[AE003590] gi:7296220 CG2720-PA [Drosophila melanogaster]
<a href="#">WTH001_0005_A23</a>	613	<a href="#">gp:BC034531_1_1</a>	1e-58	[BC034531] gi:21961590 similar to hypothetical protein MGC19039 [Mus musculus]>	545	<a href="#">gp:AK045441_1</a>	7e-55	[AK045441] gi:26337367 Mus musculus adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN
<a href="#">WTH001_0005_B02</a>	580	<a href="#">gpcu:B045447_1</a>	1e-76	[BC045447] gi:28374270 similar to G protein-binding protein CRFG [Danio rerio]	547	<a href="#">gp:BC005514_1</a>	8e-11	[BC005514] gi:13529611 Unknown (protein for IMAGE:3493398) [Mus musculus]>gpcu:B
<a href="#">WTH001_0005_B03</a>	193				472			
<a href="#">WTH001_0005_B04</a>	615	<a href="#">spu:ADHX_OCTVU</a>	2e-75	Alcohol dehydrogenase class III (EC 1.1.1.1) (Glutathione-dependent formaldehyde	611	<a href="#">spu:ADHX_SPAAU</a>	8e-75	Alcohol dehydrogenase class III (EC 1.1.1.1) (Glutathione-dependent formaldehyde
<a href="#">WTH001_0005_B07</a>	581	<a href="#">gp:AF125971_6</a>	2e-31	[AF125971] gi:14916394 Hypothetical protein Y4C6B.6 [Caenorhabditis elegans]	686	<a href="#">prf:1411186B</a>	1e-49	lactase phlorizin hydrolase - Oryctolagus cuniculus (domestic rabbit)
<a href="#">WTH001_0005_B09</a>	381	<a href="#">gp:AE003704_21</a>	6e-10	[AE003704] gi:10726524 CG3321-PA [Drosophila melanogaster]>gp:AE003704_22 [AE00	363	<a href="#">gpcu:AY232167_1</a>	0.006	[AY232167] gi:38048575 similar to Drosophila melanogaster CG3321 [Drosophila ya
<a href="#">WTH001_0005_B11</a>	643							
<a href="#">WTH001_0005_B12</a>	112				594	<a href="#">gp:AF453501_1</a>	6e-08	[AF453501] gi:21449383 unknown [Actinosynnema pretiosum subsp. auranticum]
<a href="#">WTH001_0005_B15</a>	734	<a href="#">pir:T11351</a>	1e-95	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I - Daphnia pulex mitochondrion>gp:AF117	508	<a href="#">pir:T11351</a>	4e-74	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I - Daphnia pulex mitochondrion>gp:AF117
<a href="#">WTH001_0005_B17</a>	485	<a href="#">gp:AK052476_1</a>	2e-22	[AK052476] gi:26342705 Mus musculus 13 days embryo lung cDNA, RIKEN full-length	475			
<a href="#">WTH001_0005_B18</a>	594	<a href="#">gp:AF400197_1</a>	3e-40	[AF400197] gi:15213788 ribosomal protein L35A [Spodoptera frugiperda]	418	<a href="#">gp:AF400197_1</a>	8e-41	[AF400197] gi:15213788 ribosomal protein L35A [Spodoptera frugiperda]
<a href="#">WTH001_</a>		<a href="#">gp:DP</a>	~				1e	



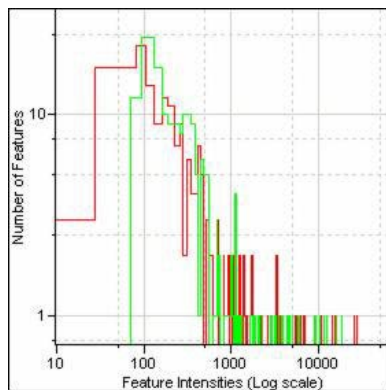
図2 オリゴDNAの固定化



### 図3 試作したDNAマイクロアレイの評価



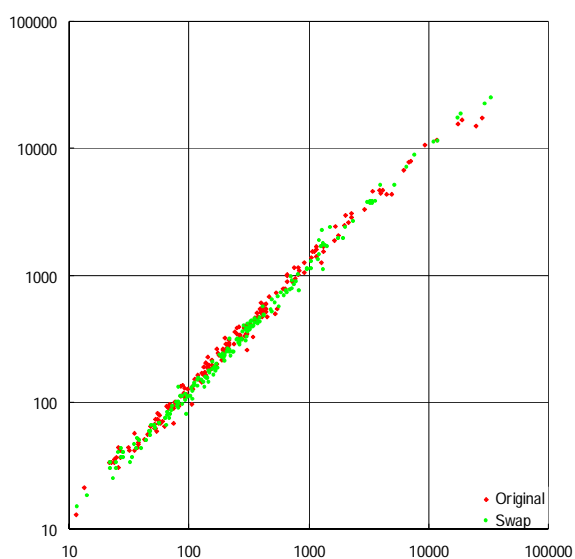
アレイスキャンイメージの例  
(ここではフェノキシカルブ処理  
した実験のスキャンデータを示  
している。)  
形状、明るさともに優れている



画像スキャン時のそれぞれの  
蛍光強度の度数分布  
バックは緑がやや高くなるものの、  
実際の計測には問題ない。

図4 作製したDNAマイクロアレイの評価(1)  
セルフハイブリダイゼーション

セルフハイブリダイゼーションの相関	exp1 (original)	exp2 (swap)	相関係数
SampleA	Cy3	Cy5	0.97
SampleB	Cy5	Cy3	0.99



同じRNAから独立にCy3,Cy5で標識したプローブを用いて、ハイブリダイゼーションを行った。増幅、標識においてバイアスがかかる場合、対角線上からはずれ、相関が低下するはずであるが、今回作製したアレイでは、非常に高い相関が示された。

## 図5 DNAマイクロアレイの再現性の確認

ミジンコから得られたRNAを別々に増幅、蛍光ラベルした。  
 (AをCy3でラベルしたものとCy5でラベルしたもの、  
 BをCy3でラベルしたものとCy5でラベルしたもの、計4サンプル)  
 これらを2つのアレイ(exp1とexp2)で解析し、蛍光強度をプロットした。  
 同じサンプルを別の色素でラベルし別のアレイで解析した場合でも、  
 相互の比較可能な高い相関を示している(A,B)。  
 また独立にラベルしたサンプルを別のアレイで解析した場合にも高い  
 相関をしめしている(C,D)。

	exp1	exp2
SampleA	Cy3	Cy5
SampleB	Cy5	Cy3

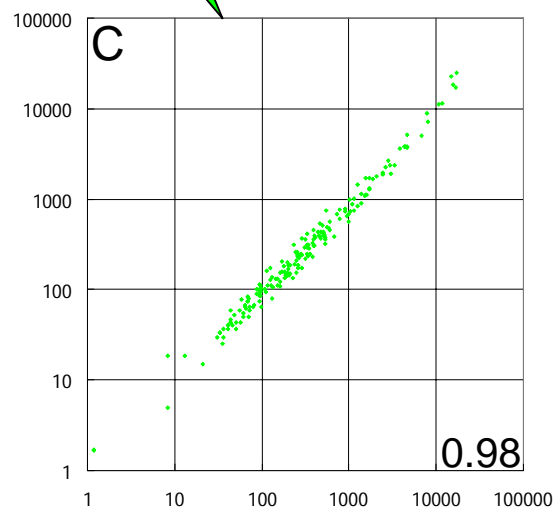
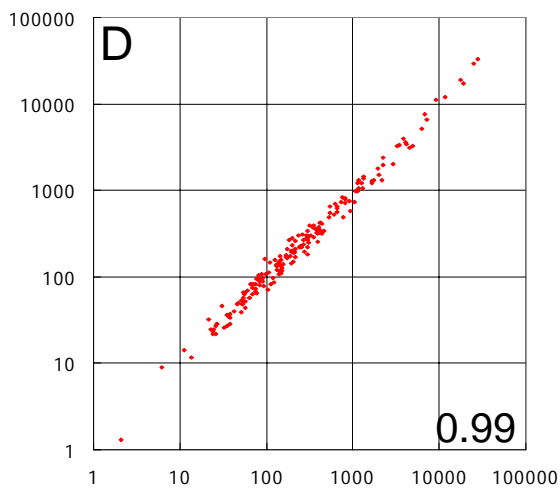
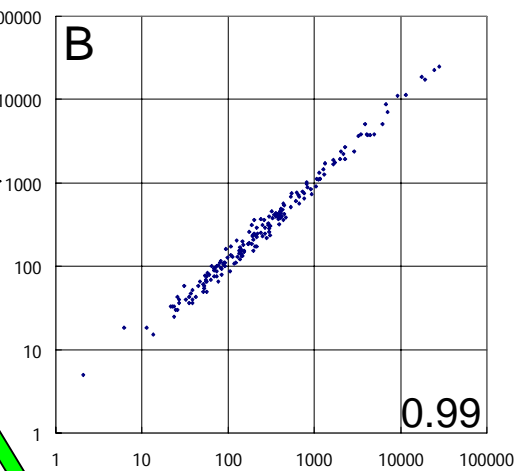
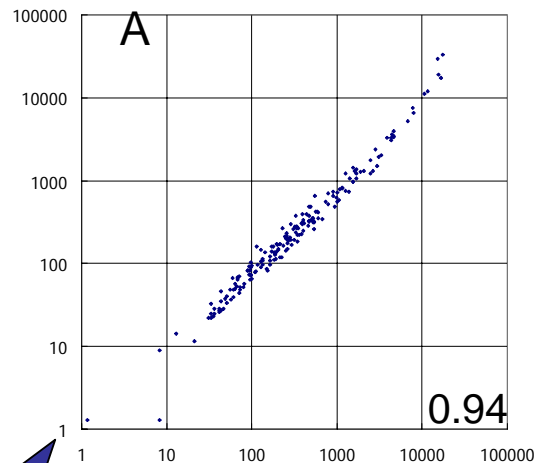


図6 ミジンコの成長における遺伝子発現の差異

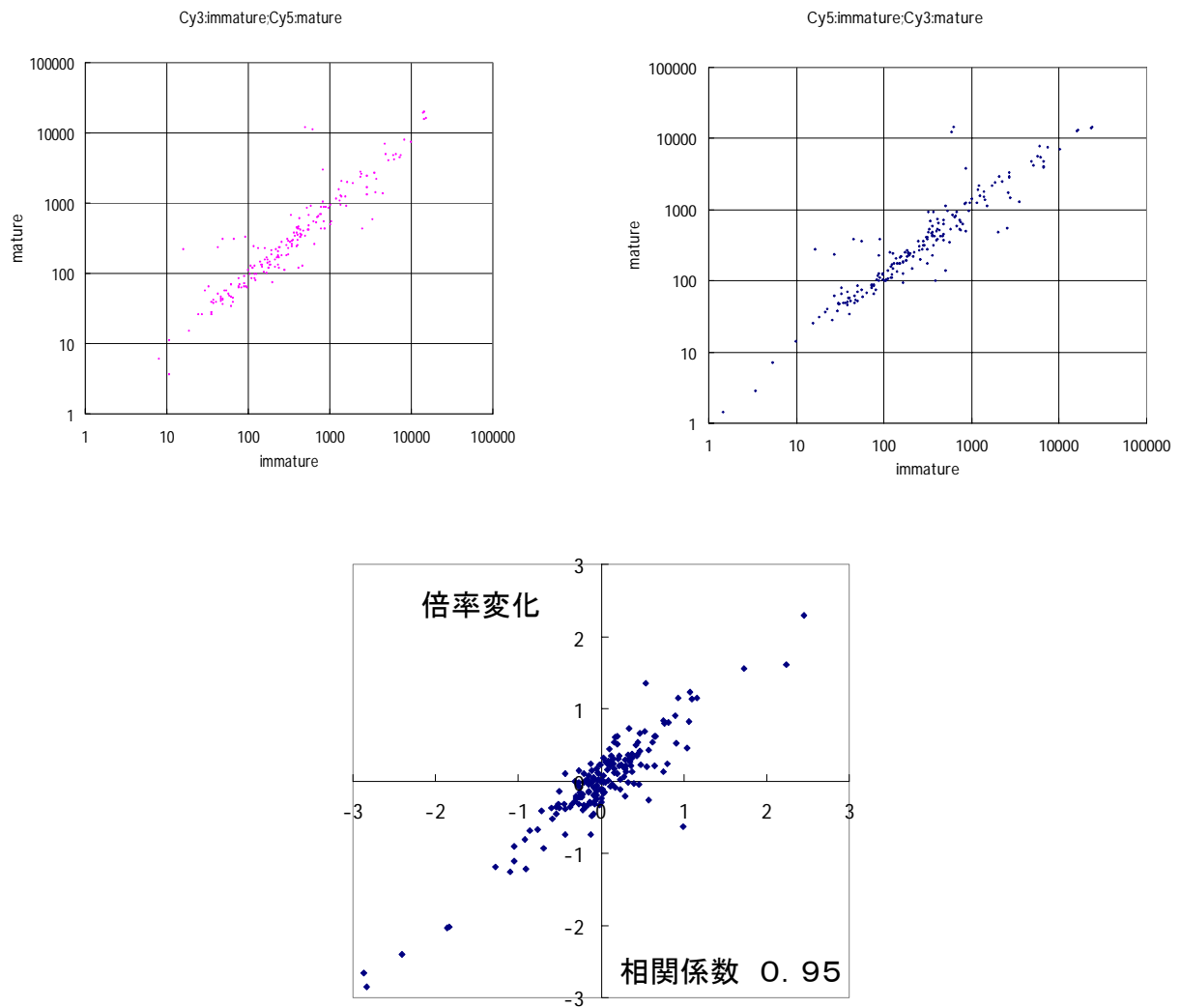


図7 フェノキシカルブ曝露時の遺伝子発現の変化

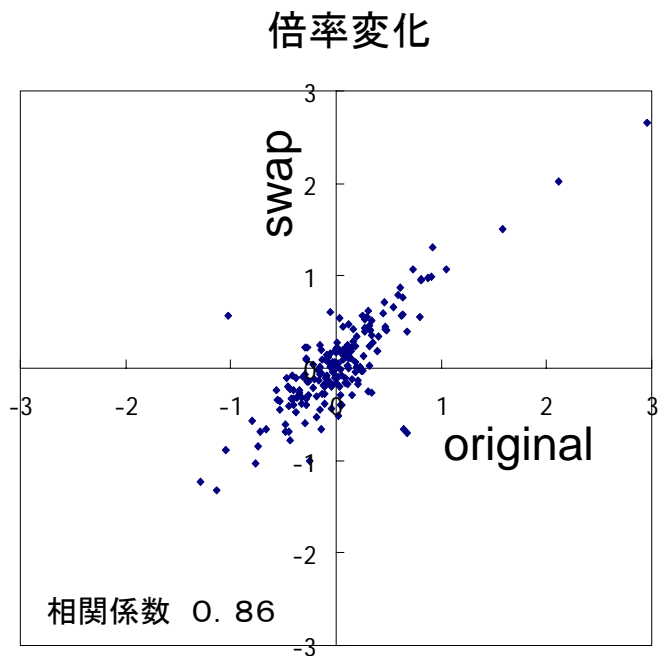
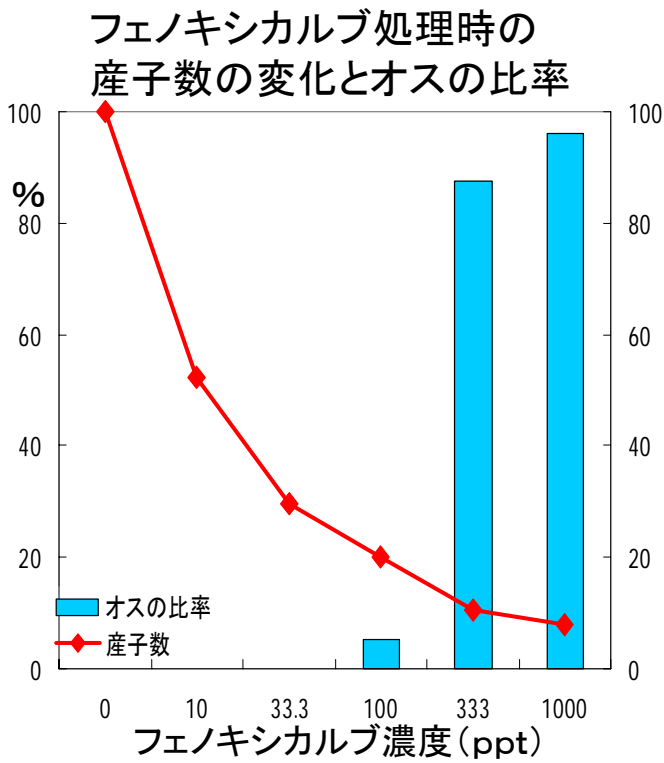
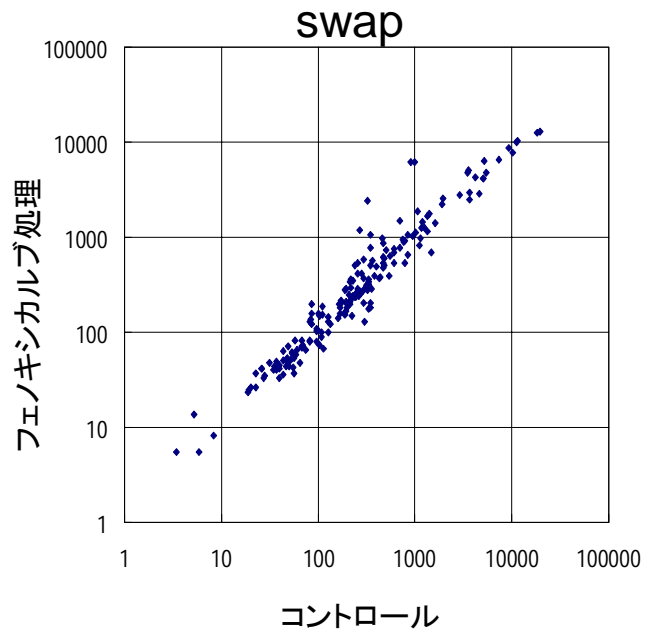
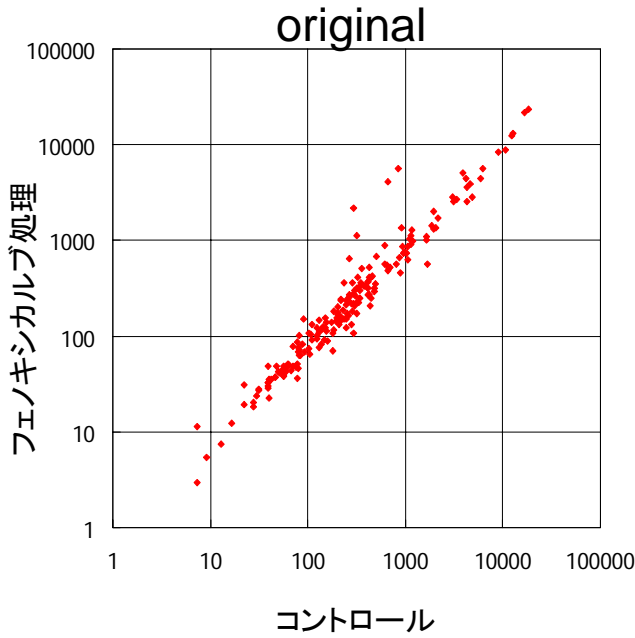


表1 DNAマイクロアレイ化したクローンのリスト

	Con. e-value	Definition
WTH001.0007.G07.r	1224	-
WTH001.0007.M18.r	155	2E-54 H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) protein 6 - Daphnia pulex mitochondrion>prf:2318218D ATPase:SUBUNIT=
WTH001.0005.B15.r	151	4E-74 cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I - Daphnia pulex mitochondrion>gp:AF117817_2 [AF117817] gi:4927671 cytochrome
WTH001.0011.D09.r	128	-
WTH001.0009.H24.r	113	1E-81 cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain III - Daphnia pulex mitochondrion>prf:2318218E cytochrome oxidase:SUBUNIT=I
WTH001.0009.H15.r	85	2E-47 [AJ245734] gi:6946693 ferritin [Daphnia pulex]
WTH001.0005.G19.r	83	1E-45 ubiquinol-cytochrome-c reductase (EC 1.10.2.2) cytochrome b - Daphnia pulex mitochondrion>gp:AF117817_12 [AF117817] gi:4
WTH001.0001.B03.r	63	1E-29 Trypsin I (EC 3.4.21.4).>sp:TRYP.ASTFL Trypsin I (EC 3.4.21.4).>pir:TRCY1 trypsin (EC 3.4.21.4) I - broad-fingered crayf
WTH001.0009.D08.r	54	-
WTH001.0012.G21.r	47	4E-73 hemoglobin - Daphnia magna>gp:AB021134_1 [AB021134] gi:4589706 hemoglobin [Daphnia magna]>gp:AB021137_1 [AB021137] c
WTH001.0001.D14.r	44	6E-24 collagenase 1 - Uca pugnator (Atlantic sand fiddler crab)>gp:UPU49931_1 [U49931] gi:1314481 serine collagenase 1 precu
WTH001.0005.N13.r	41	1E-16 myosin light chain 2 - fruit fly (Drosophila melanogaster)>prf:1203346A myosin L2 - Drosophila melanogaster>prf:130
WTH001.0007.C17.r	40	5E-33 [AJ583519] gi:35208833 beta-1,3-glucan binding protein [Homarus gammarus]
WTH001.0007.C17.r	40	5E-33 [AJ583519] gi:35208833 beta-1,3-glucan binding protein [Homarus gammarus]
WTH001.0011.J13.r	39	7E-51 NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain 4 - Daphnia pulex mitochondrion>gp:AF117817_9 [AF117817] gi:4927678
WTH001.0009.N09.r	34	5E-88 hemoglobin - Daphnia magna>gp:AB021134_3 [AB021134] gi:4589708 hemoglobin [Daphnia magna]>gp:AB021136_1 [AB021136] c
WTH001.0004.F12.r	34	3E-05 [AB051391] gi:25006237 GM2 activator protein [Rattus norvegicus]
WTH001.0007.L07.r	29	-
WTH001.0009.N05.r	26	2E-52 NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain 1 - Daphnia pulex mitochondrion>gp:AF117817_13 [AF117817] gi:4927682
WTH001.0007.A20.r	24	2E-06 [BC061262] gi:38174689 Unknown (protein for MGC:75694) [Silurana tropicalis]
WTH001.0006.H08.r	11	2E-30 retinol dehydrogenase - Spodoptera frugiperda (fall armyworm)>gp:SFU28654_1 [U28654] gi:1403598 retinol dehydratase [Spo
WTH001.0001.F09.r	10	8E-51 [AF164152] gi:5690416 ribosomal protein L8 [Anopheles gambiae]
WTH001.0005.K19.r	10	3E-33 Carboxypeptidase A1 precursor (EC 3.4.17.1).>prf:2509364A carboxypeptidase A1 - Sus scrofa domestica (domestic pig)
WTH001.0006.G13.r	10	1E-25 [AF486488] gi:27373057 trypsin [Aplysina fistularis]
IGU001.0016.H07.r	7	-
WTH001.0003.P01.r	7	-
WTH001.0006.M17.r	7	2E-33 [AF077609] gi:4322274 glutathione S-transferase [Boophilus microplus]
WTH001.0007.D04.r	7	1E-18 ornithine decarboxylase antizyme - African clawed frog>prf:2113204A Orn decarboxylase antizyme - Xenopus laevis (Af
WTH001.0005.A09.r	7	8E-16 [AE003805] gi:7302862 CG6472-PA [Drosophila melanogaster]
WTH001.0007.G21.r	3	-
WTH001.0007.P07.r	3	-
WTH001.0012.F14.r	3	6E-25 diazepam-binding inhibitor - laughing frog>prf:2016506A diazepam-binding inhibitor - Rana ridibunda (laughing frog)>gp:
IGU001.0018.H04.r	2	-
WTH001.0013.D24.r	2	-
IGU001.0033.C01.r	2	-
WTH001.0006.B03.r	2	-
WTH001.0007.M07.r	2	1E-58 [AY278948] gi:37654720 proteasome alpha 4 subunit [Branchiostoma belcheri tsingtaunese]
WTH001.0009.M08.r	2	4E-19 NADPH-cytochrome P450 reductase (EC 1.6.2.4) (CPR) (P45OR).>sp:NCPR_MUSDO NADPH-cytochrome P450 reductase (EC 1.
IGU001.0006.A03.r	1	2E-66 [AF070548] gi:3387911 2-oxoglutarate carrier protein [Homo sapiens]>gp:BC006508_1 [BC006508] gi:13676350 Unknown (prote
IGU001.0007.F02.r	1	2E-15 [BC044152] gi:28278316 Similar to nucleosome assembly protein 1-like 1 [Danio rerio]>gpu:BC044152_1 [BC044152] gi:28278
IGU001.0007.F03.r	1	-
IGU001.0007.G07.r	1	-
IGU001.0008.F06.r	1	4E-22 [BC045516] gi:28278019 Similar to RIKEN cDNA 9930035G10 gene [Danio rerio]>gpu:BC045516_1 [BC045516] gi:28278019 Sim
IGU001.0009.B11.r	1	-
IGU001.0010.A04.r	1	1E-05 Guanine nucleotide-binding protein gamma-1 subunit.>sp:GBG1_DROME Guanine nucleotide-binding protein gamma-1 subunit.>p
IGU001.0010.A11.r	1	2E-21 [AL117345] gi:8218102 dJ416F21.1 (phosphodiesterase 10A) [Homo sapiens]
IGU001.0011.A03.r	1	1E-04 [AF435075] gi:16798648 cuticular protein [Myzus persicae]
IGU001.0012.A05.r	1	-
IGU001.0013.D04.r	1	-
IGU001.0017.D11.r	1	-
IGU001.0017.F10.r	1	2E-20 Ubiquitin-protein ligase E3A (EC 6.3.2.-) (Oncogenic protein- associated protein E6-AP).
IGU001.0018.C02.r	1	1E-27 [AF274877] gi:14578846 Ah receptor interacting protein [Danio rerio]
IGU001.0018.E07.r	1	-
IGU001.0018.F07.r	1	-
IGU001.0019.A04.r	1	-
IGU001.0021.B06.r	1	5E-04 [BC045936] gi:28278449 Similar to heme binding protein 2 [Danio rerio]>gpu:BC045936_1 [BC045936] gi:28278449 Similar t
IGU001.0022.A08.r	1	4E-75 calmodulin - Drosophila melanogaster
IGU001.0022.E05.r	1	-
IGU001.0024.G01.r	1	1E-25 Elongation factor 1-beta'.
IGU001.0026.B08.r	1	2E-05 [BC045894] gi:28279669 Similar to ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9) isofor
IGU001.0027.D09.r	1	1E-31 [AF077609] gi:4322274 glutathione S-transferase [Boophilus microplus]
IGU001.0028.D09.r	1	0.017 protein C45G9.11 [Imported] - Caenorhabditis elegans
IGU001.0028.H04.r	1	-
IGU001.0029.G02.r	1	3E-10 [AE003723] gi:23171661 CG7697-PA [Drosophila melanogaster]>gp:AF170082_1 [AF170082] gi:5713194 cleavage stimulation fac
IGU001.0030.E10.r	1	2E-25 chitinase (EC 3.2.1.14) - yellow fever mosquito>gp:AF026492_1 [AF026492] gi:2564721 chitinase [Aedes aegypti]
IGU001.0034.B12.r	1	7E-28 DNA-directed RNA polymerase II 7.6 kDa polypeptide (EC 2.7.7.6) (RPB10) (RPB7.6).>sp:RPBX_DROME DNA-directed RNA polymer
IGU001.0034.D01.r	1	0.003 Venom allergen 5 (Antigen 5) (Ag5) (Allergen Dol a 5) (Dol a V).>sp:VA5_DOLAR Venom allergen 5 (Antigen 5) (Ag5) (Allerg
IGU001.0034.D03.r	1	0.003 [AY231654] gi:38047549 similar to Drosophila melanogaster TpnC47D [Drosophila yakuba]
IGU001.0037.B03.r	1	9E-31 Vacuolar ATP synthase subunit E (EC 3.6.3.14) (V-ATPase E subunit) (Vacuolar proton pump E subunit) (V-ATPase 28 kDa sub
IGU001.0039.G12.r	1	1E-06 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase) (Ubiquitin carrier protein) (Effete prot
IGU001.0040.G01.r	1	-
IGU001.0041.E03.r	1	2E-17 Selenoprotein M precursor (SelM protein).>sp:SELM_MOUSE Selenoprotein M precursor (SelM protein).
IGU001.0045.F09.r	1	4E-20 [AB081843] gi:19698255 cathepsin L-like [Engraulis japonicus]
IGU001.0046.C04.r	1	-
IGU001.0049.A12.r	1	2E-09 C-ETS-2 protein.>pir:TVCHE2 transcription factor ets-2 - chicken>prf:1405230A c-ets2 gene - Gallus gallus (chicken)
IGU001.0049.E03.r	1	2E-04 Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 precursor (Flamingo homolog 1) (hFmi1) (Multiple epidermal growth factor-I
IGU001.0049.F02.r	1	2E-22 [AF484414] gi:33320668 cytochrome P450 CYP314a1 [Drosophila melanogaster]
IGU001.0051.B08.r	1	-
IGU001.0051.C04.r	1	5E-18 protein kinase (EC 2.7.1.37), cAMP-dependent, type I regulatory chain - California sea hare>gp:ACN4PKA_1 [X62382] gi:558
IGU001.0051.F11.r	1	9E-17 [BC000004] gi:12652533 Unknown (protein for MGC:2637) [Homo sapiens]
IGU001.0051.H02.r	1	5E-11 [AY194225] gi:28195649 kynurenine monooxygenase [Aedes aegypti]
IGU001.0053.A11.r	1	-
IGU001.0054.B06.r	1	-
IGU001.0054.F11.r	1	7E-31 Lysosomal aspartic protease precursor (EC 3.4.23.-).>pir:A45117 aspartic proteinase (EC 3.4.23.-), lysosomal - yellow fe
WTH001.0001.A20.r	1	1E-49 [AF100743] gi:5138999 NADH-Ubiquinone reductase [Homo sapiens]
WTH001.0001.B04.r	1	2E-05 [AE003817] gi:7303275 CG6305-PA [Drosophila melanogaster]>gp:AY060758_1 [AY060758] gi:16768174 GH20904p [Drosophila r
WTH001.0001.D10.r	1	1E-44 [AE003585] gi:22945470 CG17654-PA [Drosophila melanogaster]
WTH001.0001.D22.r	1	-
WTH001.0001.E05.r	1	1E-16 Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2).>pir:CPCYB carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2) - broad-fingered crayfish>prf:1004229A
WTH001.0001.F20.r	1	-
WTH001.0001.F20.r	1	-
WTH001.0001.I07.r	1	-
WTH001.0001.O03.r	1	-

WTH001.0001.P16.r 1 0.009 [AF277452] gi:11320978 Pkd1 [Rattus norvegicus]  
WTH001.0002.E24.r 1 2E-13 [AY034137] gi:16073616 aldehyde dehydrogenase [Rattus norvegicus]  
WTH001.0002.H24.r 1 -  
WTH001.0002.K18.r 1 0.018 Putative extracellular sulfatase Sulf-1 homolog precursor (EC 3.1.6.-) (CeSulf-1)->pir:T16584 hypothetical protein K09C4  
WTH001.0002.L17.r 1 0.003 alphaP integrin - sea urchin (Strongylocentrotus purpuratus)->gp:AF177914\_1 [AF177914] gi:5911264 alphaP integrin precu  
WTH001.0003.C16.r 1 3E-62 activated protein kinase C receptor RACK1 - rat-prf:2004461A protein kinase C receptor - Rattus norvegicus (Norway  
WTH001.0003.F11.r 1 2E-24 collagenase 1 - Uca pugilator (Atlantic sand fiddler crab)->gp:UPU49931\_1 [U49931] gi:1314481 serine collagenase 1 precu  
WTH001.0003.F12.r 1 9E-10 [AF353357] gi:17252684 opsin [Skogsbergia lernerii]  
WTH001.0003.M07.r 1 -  
WTH001.0003.N02.r 1 -  
WTH001.0004.C10.r 1 8E-45 [M61850] gi:187053 lactase phlorizinhydrolase [Homo sapiens]  
WTH001.0004.D24.r 1 -  
WTH001.0004.I16.r 1 1E-57 Tubulin alpha chain->pir:S52152 tubulin alpha chain - silkworm-prf:2408297A tubulin:SUBUNIT=alpha - Bombyx mori (si  
WTH001.0004.I16.r 1 1E-57 Tubulin alpha chain->pir:S52152 tubulin alpha chain - silkworm-prf:2408297A tubulin:SUBUNIT=alpha - Bombyx mori (si  
WTH001.0004.K15.r 1 -  
WTH001.0004.M07.r 1 2E-80 Dihydropolipamide dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.8.1.4).>sp:DLDH\_PIG Dihydropolipamide dehydrogenase, mitoch  
WTH001.0004.M08.r 1 -  
WTH001.0004.N12.r 1 2E-53 [AY032658] gi:15418786 iron regulatory protein 1 [Manduca sexta]  
WTH001.0004.O05.r 1 -  
WTH001.0004.O20.r 1 -  
WTH001.0005.A17.r 1 -  
WTH001.0005.G13.r 1 4E-48 [AE003839] gi:7304149 CG1548-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AF220040\_1 [AF220040] gi:6685167 cathepsin D precursor [D  
WTH001.0005.H09.r 1 -  
WTH001.0005.K15.r 1 -  
WTH001.0005.N11.r 1 1E-41 [AY278950] gi:37654724 adenosylhomocysteinase [Branchiostoma belcheri tsingtaunense]  
WTH001.0005.O07.r 1 2E-10 [AF137068] gi:6492289 cubilin [Canis familiaris]  
WTH001.0005.O09.r 1 2E-72 Dihydropolipamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial precursor (EC 2.3.  
WTH001.0005.O18.r 1 6E-20 Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A)->gp:AF109730\_1 [AF109730] gi:6469515 translation initiation factor  
WTH001.0005.O23.r 1 -  
WTH001.0005.P19.r 1 -  
WTH001.0006.B07.r 1 5E-43 ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14) (Protein bellwether)->sp:ATPA\_DROME ATP synthase alpha c  
WTH001.0006.B13.r 1 -  
WTH001.0006.C18.r 1 2E-71 [AY342000] gi:37498964 receptor for activated protein kinase C [Oreochromis mossambicus]  
WTH001.0006.H19.r 1 6E-05 [D50464] gi:1747306 SDR2 gene product [Mus musculus]  
WTH001.0006.I19.r 1 -  
WTH001.0006.J17.r 1 -  
WTH001.0006.K07.r 1 5E-53 Probable acyl-CoA dehydrogenase, medium-chain specific, mitochondrial precursor (EC 1.3.99.3) (MCAD)->sp:ACDM\_DROME Pro  
WTH001.0006.M08.r 1 3E-42 [AB087268] gi:23503514 Cu,Zn-superoxide dismutase [Hylobates lar]  
WTH001.0006.M15.r 1 -  
WTH001.0006.N05.r 1 2E-08 G2/mitotic-specific cyclin B->gp:CVRNACYCB 1 [X90984] gi:984661 cyclin B gene product [Chlorohydra viridissima]  
WTH001.0006.N23.r 1 7E-04 [BC015368] gi:34782981 DCP1B protein [Homo sapiens]  
WTH001.0007.A07.r 1 9E-12 [AE003542] gi:7294614 CG6811-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AY069311\_1 [AY069311] gi:17861958 LD02491p [Drosophila n  
WTH001.0007.B03.r 1 4E-45 [AE003464] gi:21626770 CG3683-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AE003464\_68 [AE003464] gi:21626771 CG3683-PB [Drosopi  
WTH001.0007.F03.r 1 -  
WTH001.0007.G13.r 1 1E-06 post-ecdysial adult protein - Tenebrio molitor (yellow mealworm)->gp:TMLPCP29\_1 [AJ000044] gi:2275132 cuticular protein [T  
WTH001.0007.G16.r 1 4E-11 Cystathionine beta-synthase (EC 4.2.1.22) (Serine sulphydrase) (Beta-thionase)->sp:CBS\_HUMAN Cystathionine beta-synthase  
WTH001.0007.G17.r 1 4E-05 CUB and sushi multiple domains protein 3 precursor.  
WTH001.0007.I01.r 1 -  
WTH001.0007.I16.r 1 1E-12 [AF453743] gi:21908024 proton/amino acid transporter 1 [Mus musculus]  
WTH001.0007.J05.r 1 -  
WTH001.0007.J18.r 1 -  
WTH001.0007.K13.r 1 8E-38 [Y11314] gi:1854503 glutamate dehydrogenase (NAD(P)+) [Drosophila melanogaster]  
WTH001.0007.M05.r 1 -  
WTH001.0007.M06.r 1 1E-04 [U61948] gi:14550353 Hypothetical protein C46A5.4 [Caenorhabditis elegans]  
WTH001.0007.M17.r 1 -  
WTH001.0007.N14.r 1 1E-30 MCM7 gene - Drosophila melanogaster->gp:AE003554\_43 [AE003554] gi:7295030 CG4978-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AF12  
WTH001.0007.P18.r 1 -  
WTH001.0009.A04.r 1 0.01 exoskeletal protein:ISOTYPE=HaCP18.8 - Homarus americanus (American lobster)  
WTH001.0009.A20.r 1 2E-07 Putative ankyrin-repeat protein FVP115->gp:AF198100\_115 [AF198100] gi:7271613 ORF FVP115 Ankyrin repeat gene family pro  
WTH001.0009.B21.r 1 5E-16 CDK5 regulatory subunit associated protein 3 (CDK5 activator-binding protein C53) (HSF-27 protein) (MSTP016) (PP1553)->g  
WTH001.0009.B24.r 1 3E-09 Transitional endoplasmic reticulum ATPase homolog 2 (p97/CDC48 homolog 2)->sp:TER2\_CAEEL Transitional endoplasmic reticu  
WTH001.0009.C07.r 1 1E-07 [AJ517411] gi:29329817 vitellogenin precursor [Apis mellifera]  
WTH001.0009.C20.r 1 2E-58 [AE003451] gi:7291184 CG32672-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AY122152\_1 [AY122152] gi:21483378 LD05816p [Drosophila  
WTH001.0009.F13.r 1 -  
WTH001.0009.G21.r 1 1E-29 hypothetical protein C50B6.7 - Caenorhabditis elegans->gp:CEC50B6\_7 [Z81050] gi:3875058 Hypothetical protein C50B6.7 [Ca  
WTH001.0009.J15.r 1 3E-12 [AF284840] gi:15076929 gamma-interferon inducible lysosomal thiol reductase [Amblyomma americanum]  
WTH001.0009.L17.r 1 -  
WTH001.0009.L24.r 1 6E-08 [AK088267] gi:26353234 Mus musculus 2 days neonate thymus thymic cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:  
WTH001.0009.M10.r 1 2E-07 [AY195856] gi:28274854 ankyrin repeat protein E4.8 [synthetic construct]->gpc:AY195856\_1 [AY195856] gi:28274854 ankyrin  
WTH001.0009.M15.r 1 1E-22 [AY391418] gi:37362204 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5 [Danio rerio]  
WTH001.0009.P15.r 1 -  
WTH001.0010.B11.r 1 3E-22 [AE003681] gi:7299110 CG11964-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AY051943\_1 [AY051943] gi:15292197 LD41978p [Drosophila  
WTH001.0010.C05.r 1 -  
WTH001.0010.D05.r 1 2E-20 Alcohol dehydrogenase class III (EC 1.1.1.1) (Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase) (EC 1.2.1.1) (FDH)->sp:A  
WTH001.0010.D16.r 1 4E-16 Putative serine/threonine-protein kinase C41C4.4 in chromosome II precursor (EC 2.7.1.-)->pir:T19874 hypothetical protei  
WTH001.0010.H08.r 1 2E-44 aldolase:ISOTYPE=A - Xenopus laevis (African clawed frog)->gp:AB002267\_1 [AB002267] gi:1944025 aldolase [Xenopus laevis]>  
WTH001.0010.I15.r 1 1E-26 [AB038695] gi:8176557 heart fatty acid binding protein [Anguilla japonica]->gp:AB039665S2\_1 [AB039666] gi:8176561 heart  
WTH001.0010.I20.r 1 5E-35 Cytochrome P450 17A1 (EC 1.14.99.9) (CYPXVII) (P450-C17) (P450c17) (Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase)->sp:CPT7\_C  
WTH001.0010.K22.r 1 4E-62 [AE003462] gi:21626717 CG3195-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AE003462\_115 [AE003462] gi:21626718 CG3195-PB [Drosopi  
WTH001.0010.L17.r 1 -  
WTH001.0010.M02.r 1 -  
WTH001.0010.M23.r 1 4E-15 cellular nucleic acid-binding protein - Gallus gallus (chicken)->gp:AF035676\_1 [AF035676] gi:2665788 cellular nucleic aci  
WTH001.0010.O18.r 1 6E-26 [AJ010150] gi:5725367 carnitine palmitoyltransferase I [Drosophila melanogaster]  
WTH001.0011.F03.r 1 9E-39 [AF165113] gi:6636407 membrane import protein [Drosophila melanogaster]  
WTH001.0011.J24.r 1 -  
WTH001.0012.B10.r 1 1E-16 cuticle structural protein PCP16.7, post-ecdysial - yellow mealworm-prf:2421326B cuticular protein:ISOTYPE=TmPCP16.  
WTH001.0012.B10.r 1 1E-16 cuticle structural protein PCP16.7, post-ecdysial - yellow mealworm-prf:2421326B cuticular protein:ISOTYPE=TmPCP16.  
WTH001.0012.B12.r 1 -  
WTH001.0012.D08.r 1 -  
WTH001.0012.E19.r 1 6E-22 [AJ271365] gi:18413497 endo-1,4-mannanase [Mytilus edulis]  
WTH001.0012.F04.r 1 0.007 hypothetical protein T10E10.2 - Caenorhabditis elegans  
WTH001.0012.F08.r 1 5E-19 [AF224720] gi:7021482 secretory carrier membrane protein [Drosophila melanogaster]  
WTH001.0012.F10.r 1 -  
WTH001.0012.J07.r 1 4E-18 SEC14-like protein 3 (Tocopherol-associated protein 2)->gp:AC004832\_3 [AC004832] gi:6624132 WUGSC:H\_DJ0539M06.3 gene p  
WTH001.0012.O13.r 1 -



WTH001_0013_A20.r	1	6E-26	[AF353331] gi:17225632	opsin [Vargula hilgendorffii]
WTH001_0013_B03.r	1	-	-	-
WTH001_0013_B13.r	1	2E-28	[AJ303080] gi:13624645	arrestin [Ascalaphus macaronius]
WTH001_0013_E17.r	1	-	-	-
WTH001_0013_E21.r	1	1E-21	[AF195272] gi:6708213	serine/threonine kinase AIE1 [Mus musculus]
WTH001_0013_G13.r	1	-	-	-
WTH001_0013_G19.r	1	4E-13	[AE003563] gi:7295365	CG12330-PA [Drosophila melanogaster]
WTH001_0013_G22.r	1	8E-38	GABA aminotransferase - Sus scrofa domestica (domestic pig)	
WTH001_0013_H09.r	1	-	-	-
WTH001_0013_H24.r	1	7E-55	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator homolog (dARNT) (Tango protein) (Hypoxia-inducible factor 1 beta).>sp:ARN	
WTH001_0013_J15.r	1	-	-	-
WTH001_0013_J23.r	1	1E-13	cytoplasmic fatty acid-binding protein - Schistosoma japonicum>gp:SCMFABP_1 [L23322] gi:349804	fatty acid binding protei
WTH001_0013_L16.r	1	1E-81	TGF beta-inducible nuclear protein 1 (Hairy cell leukemia protein 1) (HUSSY-29).>gp:AF077615_1 [AF077615] gi:11999092	T
WTH001_0013_M19.r	1	-	-	-
WTH001_0014_B18.r	1	-	-	-
WTH001_0014_B24.r	1	7E-50	G1/S-specific cyclin C.>sp:CG1C_DROME G1/S-specific cyclin C.>pir:A40269	cyclin C - fruit fly (Drosophila melanogaster)>
WTH001_0014_G18.r	1	-	-	-
WTH001_0014_M05.r	1	2E-17	[AY398415] gi:37681941	serine proteinase inhibitor, clade B, member 1 [Danio rerio]
WTH001_0014_M12.r	1	2E-66	hemoglobin - Daphnia magna>gp:AB021134_1 [AB021134] gi:4589706	hemoglobin [Daphnia magna]>gp:AB021137_1 [AB021137] g
WTH001_0014_N03.r	1	-	-	-
WTH001_0014_P19.r	1	0.007	[AE003799] gi:7302614	CG17531-PA [Drosophila melanogaster]

ContigはEST解析におけるリード数(多いほうが発現頻度が高いことを示す。)  
Blast検索の結果のe-valueと相同性を有する遺伝子(definition)を記した。

表2 ミジンコの成長と遺伝子発現変化

成長したミジンコで発現の高い遺伝子

倍率変化	E-value	Definition	Organism
23.34	4.00E-30	RE34950p	Drosophila melanogaster
17.80	1.00E-07	vitellogenin precursor	Apis mellifera
13.62	3.00E-03	cubilin	Rattus norvegicus
6.19	2.00E-65	Ras-related protein	Chlamydomonas reinhardtii
5.44	2.00E-11	probable protein kinase	Arabidopsis thaliana
4.54	1.00E-15	diazepam-binding inhibitor	laughing frog
3.52	3.00E-41	glutathione peroxidase	Homo sapiens
3.49	3.00E-11	cyclin B4	Xenopus laevis
2.06	3.00E-82	putative histone deacetylase	Drosophila melanogaster
2.01	7.00E-14	Similar to cyclin B3	Xenopus laevis

未成熟なミジンコで発現の高い遺伝子

倍率変化	E-value	Definition	Organism
5.82	0.003	Cylicin II	bovine
3.73	2.00E-27	P450 CYP4C39	Carcinus maenas
3.42	9.00E-10	opsin	Skogsbergia leneri
2.97	5.00E-05	AhR nuclear translocator-like	Drosophila melanogaster
2.71	3.00E-24	chitinase	yellow fever mosquito
2.56	4.00E-34	Compound eye opsin	Vargula hilgendorffii
2.56	2.00E-32	arrestin	Anopheles gambiae
2.56	8.00E-18	salivary peroxidase	Anopheles albimanus
2.18	4.00E-49	DEAD box polypeptide 5	Danio rerio
2.07	1.00E-16	post-ecdysial adult protein	Tenebrio molitor
2.06	2.00E-13	cytoplasmic fatty acid binding protein	Schistosoma japonicum
2.03	2.00E-15	troponin C	Drosophila melanogaster
2.01	2.00E-49	aspartic protease precursor	yellow fever mosquito

表3 フェノキシカルブで発現が変動する遺伝子

フェノキシカルブで発現が誘導される遺伝子

倍率変化	E-value	Definition	Organism
7.44	2.00E-66	hemoglobin	Daphnia magna
6.58	5.00E-88	hemoglobin	Daphnia magna
3.52	3.00E-24	deoxyribonuclease I	Marsupenaeus japonicus
2.42	1.00E-04	Hypothetical protein	Caenorhabditis elegans

フェノキシカルブで発現が抑制される遺伝子

倍率変化	E-value	Definition	Organism
3.01	-	Unknown	
2.70	1.00E-04	cuticular protein	Myzus persicae
2.56	1.00E-29	hypothetical protein	Caenorhabditis elegans
2.52	7.00E-55	AhR nuclear translocator homolog	Drosophila melanogaster
2.15	4.00E-18	SEC14-like protein 3	Homo sapiens
2.10	-	Unknown	
2.07	1.00E-13	cytoplasmic fatty acid-binding protein	Schistosoma japonicum
2.04	-	Unknown	