生態毒性学におけるトビムシのゲノミクスの動向

中森泰三 * ・木下圭司 ** ・久保田善久 * ・府馬正一 * ・藤森亮 *** ・金子信博 ****

* 独立行政法人放射線医学総合研究所環境放射線影響研究グループ　〒 263-8555　千葉市稲毛区穴川 4-9-1

** 名古屋大学大学院 生命農学研究科附属鳥類バイオサイエンス研究センター　〒 464-8601　名古屋市千種区不老町

*** 独立行政法人放射線医学総合研究所粒子線生物研究グループ　〒 263-8555　千葉市稲毛区穴川 4-9-1

**** 横浜国立大学大学院　環境情報研究院 土壌生態学研究室　〒 240-8501　横浜市常盤台 79-7

Received: 23 October 2007; Accepted: 26 December 2007

Abstract　Trends in collembolan genomics in ecotoxicology. Taizo Nakamori*, Keiji Kinoshita**, Yoshihisa Kubota*, Shoichi Fuma*, Akira Fujimori***, Nobuhiro Kaneko**** (*Environmental Radiation Effects Research Group, National Institute of Radiological Sciences, 4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan; **Nagoya University Avian Bioscience Research Centre, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan; ***Heavy-Ion Radiobiology Research Group, National Institute of Radiological Sciences, 4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan; ****Soil Ecology Research Group, Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, 79-7 Tokiwadai, Yokohama 240-8501, Japan). Genomics is the structural and functional study of genomes, and the application of genomic technology to ecotoxicology is known as ecotoxicogenomics. Ecotoxicogenomics is receiving increasing attention because of its potential advantages in several applications, including the identification of pollutants. Because relatively little genetic information is available for Collembola, the identification and characterization of stress-responsive genes constitute the first steps toward using these organisms in ecotoxicogenomics. Field and laboratory studies are currently underway for *Orchesella cincta* and *Folsomia candida*, respectively. In *O. cincta*, a gene for the metal binding protein, metallothionein, was identified and the microevolution of its expression was documented in field populations. In *F. candida*, which is widely used for ecotoxicity testing, a DNA microarray is being developed for risk assessment in soil ecosystems, and the Collembase, a database of collembolan expressed sequence tags (ESTs), is being developed for *F. candida* together with *O. cincta* by the research group at the Vrije University. We have begun the search for stress-responsive genes in *F. candida* using high-coverage expression profiling (HiCEP). These activities are in their initial stages, but promise to lead to considerable advances in collembolan ecotoxicogenomics.

Keywords: Collembase, ecotoxicogenomics, ESTs, HiCEP, metallothionein.

はじめに

ゲノミクス（ゲノムの構造と機能に関する研究；McKusick, 1997）の進歩を受けて生態毒性学にも遺伝子発現解析などのゲノミックツールが用いられるようになってきた．生態毒性学では生態系を構成する多様な生物が研究対象とされる．トビムシ（図 1）は「陸のプランクトン」とも呼ばれ（青木，1973），土壌に普通に見られる小型節足動物で，土壌の生態毒性学の研究対象としても広く採り上げられている（金子他，2001）．近年，トビムシの生態毒性学においてもゲノミックツールの利用がみられるようになり，今後も更なる展開が予想される．

本稿では生態毒性学におけるトビムシのゲノミクス研究の動向を紹介する．まず，背景としてエコトキシコゲノミクスと呼ばれる研究分野について述べ，土壌動物全体のエコトキシコゲノミクスにおけるトビムシの研究の進み具合を相対的に明確にする．次いで，トビムシの一般的な解説を行い，生態毒性学におけるトビムシの遺伝子あるいはタンパク質発現に関する研究をレビューする．最後に，我々の取り組みを紹介する．

尚，本稿に出てくる専門用語には簡単な解説を付記した．特に重要と思われるものについては，表 1 にまとめた．

エコトキシコゲノミクス

ゲノム情報の蓄積にともない，DNA マイクロアレイと呼ばれる多数（数千）の遺伝子の発現解析を一度に行

表 1. 用語説明

用語	説明
cDNA（complementary DNA：相補的 DNA）	mRNA を鋳型として作られた DNA.
DNA マイクロアレイ	多数の遺伝子の発現解析を一度に行えるツール（図 2 参照）. 解析対象を遺伝子の代わりに生物種にすれば群集解析にも応用できる.
EST（expressed sequence tag）	mRNA を鋳型として作られた DNA の断片的塩基配列. 通常，個々の遺伝子を認識できる程度の長さを持ち，DNA マイクロアレイの遺伝子識別のためのプローブなどに利用される.
HiCEP（high-coverage expression profiling：高カバー率発現プロファイリング）	遺伝子の塩基配列情報があらかじめ知られていない生物でも網羅的な遺伝子発現解析ができるツール（図 4 参照）.
mRNA（messenger RNA）	DNA の塩基配列情報をタンパク質が合成される場所へ伝える働きをする RNA.
アレル（allele）	染色体上のある領域における択一的な変異型.
遺伝子	ある機能的なまとまりをもったゲノム上の領域. タンパク質や機能的あるいは構造的な RNA 分子をコードするための領域（コード領域）. あるいは，コード領域に遺伝子発現を調節する領域（調節領域）を含めたもの. 定義に関する議論は Pearson（2006），Gerstein *et al.*（2007）参照.
遺伝子発現	遺伝子にコードされた情報が細胞構造・機能物質に変換される過程.
エコトキシコゲノミクス	ゲノミクスの手法を生態毒性学に適用した研究.
ゲノミクス	ゲノムの構造と機能に関する研究.
ゲノム	生物の染色体中の全情報伝達物質.
ストレス	外的な要因によって引き起こされる生物の内的な状態.
ストレス応答	ストレスによって誘発される内的な変化のカスケード.
ストレッサー	ストレスを引き起こす外的要因.
バイオマーカー	生物における測定可能な分子生物学，生化学，生理学的指標. 分子レベルの指標を指すことが多いが，生理学的指標として行動にも用いられる. これに対し，バイオインディケーターは生物そのものを指す.
発現プロファイリング	どの遺伝子がどれだけ発現しているか調べること.
プロモーター	遺伝子の転写開始を調節する領域.
メタロチオネイン	システインに富む金属結合性のタンパク質.

えるツール（図 2）が開発され，ヒトを対象とした毒性学（Afshari et al., 1999; 森，2005; 渡邉と井口，2005），そして環境生物を対象とした生態毒性学へ適用されるようになってきた（Lettieri, 2006; 渡邉，2006）. Snape et al.（2004）は，ゲノミクスの手法を生態毒性学（エコトキシコロジー）に適用した研究分野を表す語として「エコトキシコゲノミクス」を提案した. 具体的には，重要な環境生物の環境毒物曝露における遺伝子やタンパク質発現の研究を指す（Snape et al., 2004）.

エコトキシコゲノミクスのアプローチとして，毒性メカ

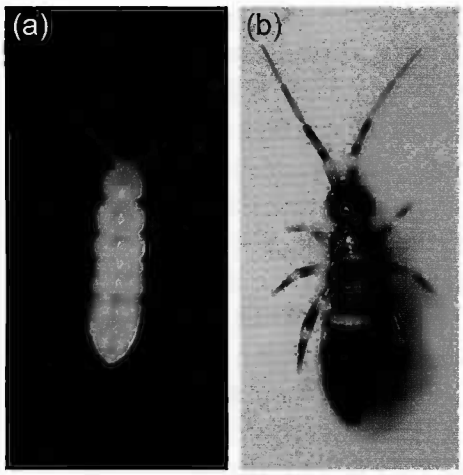

図 1. トビムシ.

(a) *Folsomia candida*. 日本を含め，汎世界的に分布し，飼育が容易であるため室内実験に広く用いられている．(b) *Orchesella cincta*. ヨーロッパに分布し，野外研究に盛んに用いられている．

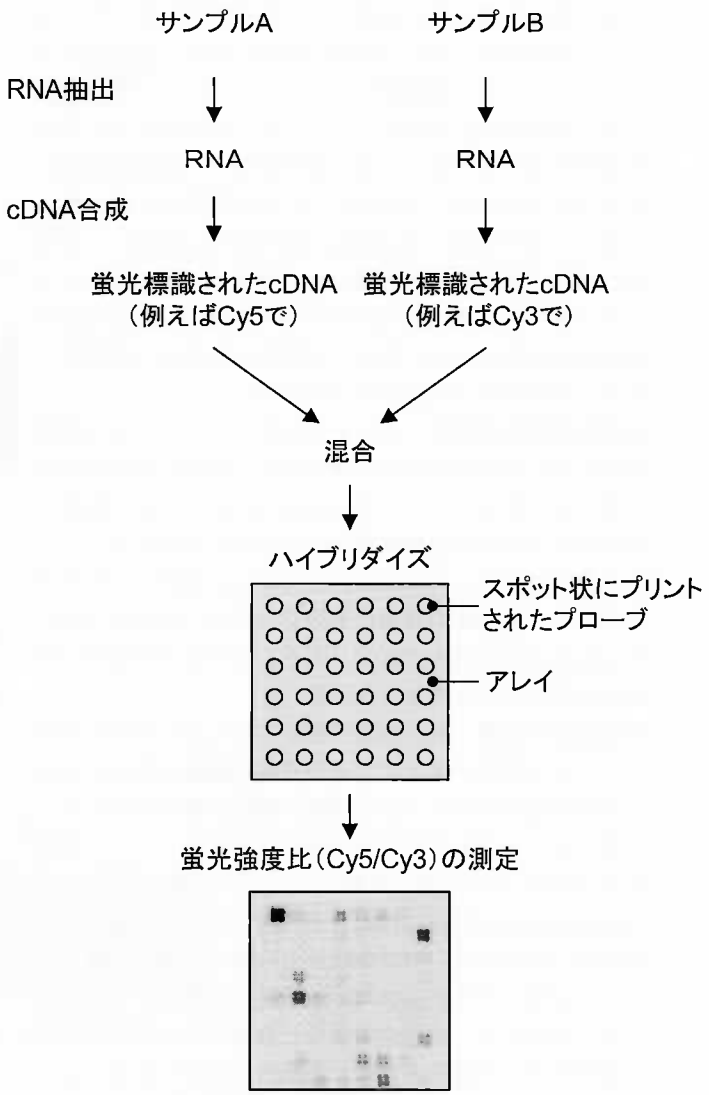

図 2. DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリング解析の概略.

DNAマイクロアレイには数タイプあり，ここではspotted cDNA microarrayと呼ばれるものを例として採り上げる．アレイ上には既知の相補的DNA（complementary DNA: cDNA）やexpressed sequence tag（EST）をもとに準備されたプローブ（遺伝子断片）がスポット状にプリントされる．解析対象は，遺伝子発現を比較したい2つのサンプルから抽出されたRNAに由来するcDNAである．2つのcDNAを異なる蛍光（例：Cy3（赤）やCy5（緑））で標識する．これらのcDNAを混合し，アレイ上のプローブと接触させる処理を行う．この際，プローブと相補的な配列をもつサンプルはプローブにハイブリダイズ（塩基対をつくって二本鎖を形成する）しアレイ上に固定される．処理後，アレイのスポット上の蛍光を測定し，色の異なる蛍光の強度比から，2サンプル間の遺伝子発現量の比較を行う．一度に解析できる遺伝子の数はスポットの数に依存し，数千から数万種類の遺伝子発現プロファイリング解析が可能である．Schulze and Downward (2001) を改変.

ニズムの理解，毒性影響や生物濃縮を推測するモデルの開発，定量的構造活性相関（quantitative structure-activity relationship: QSAR; 化学物質の構造と毒性・性質の定量的関連・相関；若林，1998）の開発，バイオマーカーの開発，バイオマーカーと生態系影響のリンク，そして，これらの知見を新規化学物質の生態リスクの予測に利用すること，などが挙げられる（Snape et al., 2004）.

エコトキシコゲノミクスは生態リスク評価において様々な潜在的利点を有しており，イギリスやアメリカの環境関係の省庁や（Kille et al., 2003; U. S. Environmental Protection Agency, 2004），環境汚染対策を進めている国際機関である経済協力開発機構（Organization for Economic Cooperation and Development; OECD, 2005）においても注目されており，室内で行われる毒性試験や野外個体群のモニタリングなどへの適用が検討されている.

エコトキシコゲノミクスの潜在的利点と課題

エコトキシコゲノミクスの潜在的利点として以下のものが挙げられる：

- **毒性物質への曝露評価の改善**．生物が実際に曝露する汚染物質の量は，非生物的あるいは生物的な様々な環境要因の影響を受け，環境中の全量に相関するとは限らない．曝露量は，汚染物質の物理化学的性状や環境中での不均一分布，生物の行動，餌生物による濃縮，などに左右される．ストレス応答は生物体内の現象であり，

それに関わる遺伝子の発現は，生物が実際に受けているストレスの指標となり，曝露（あるいはバイオアベイラビリティー）や有害影響のバイオマーカーとして利用できる（Snape et al., 2004）．バイオマーカーは必ずしも有害影響を指し示すものである必要はなく，曝露の特徴を示すものであれば，次に起こりうる影響の予測に利用することができる（Neumann and Galvez, 2002）．その他，遺伝子発現解析から得られる情報はバイオアベイラビリティーを予測するモデルの一つである biotic ligand model（Di Toro et al., 2001）の開発にも役立つと期待される（Neumann and Galvez, 2002）．

・**毒性作用様式の解明**．遺伝子の発現パターンやその時間的変化から有害物質の作用様式やそれに関わる代謝経路を明らかにすることができ（Snape et al., 2004），複合汚染における複雑な生物影響の特徴づけもできるようになると期待される（Neumann and Galvez, 2002）．それらの知見は，QSAR の開発にも役立つほか（Lettieri, 2006; Neumann and Galvez, 2002），以下に述べる汚染物質の診断や種間外挿にも役立てられる．

・**汚染物質の診断**．有害物質の種類ごとに遺伝子群の発現パターンの理解が進めば，未知試料の曝露で得られた遺伝子群の発現パターンをそれらの既知の発現パターンと比較することで有害物質の種類を同定するといった診断的な生態リスク評価も可能となる（図 3; Lettieri, 2006; Neumann and Galvez, 2002）．そうなれば，汚染物質の情報が無い環境試料中の汚染物質の診断や，複合汚染下における主要リスク要因の同定，新規化学物質の判別分類などに利用でき，浄化や規制などの汚染対策や生態リスク管理において有効な情報が効率的に得られるようになる．

・**毒性影響の生物種間外挿の改善**．これは，限られた生物種についてのデータから生態系全体への影響を予測するために必要であり，エコトキシコゲノミクスにおける重要課題として認識されている（生態系を構成する全生物種について毒性データを取得することは現実的でない）．ゲノミックツールにより作用の様式が明らかにされれば，この種間外挿の精度が改善される（Ankley et al., 2006）．例えば，ゲノミックツールにより生物種間で保存性の高い毒性の作用様式と高くない作用様式を同定することができ，それにより，ある種から別の種への毒性データの外挿が妥当なものであるかを判断することができるようになる．有薗と冨永（2005）は，センチュウとヒトの遺伝子発現を比較し，種間外挿への展望を見出している．また，種間比較研究を容易にするために，様々な生物における化学物質の分子レベルの応答に関するデータベースが公開されている（Mattingly et al., 2006）．

以上のような潜在的な利点に関心が高まる一方で，エコトキシコゲノミクスには大きな問題がある．それは，これまで生態毒性学で用いられてきた環境生物ではゲノム情報が不足しており，そのような生物では，遺伝子発現解析自体に制約があるという点である（Lettieri, 2006）．したがって，まずは，有用な遺伝子を同定することからはじめるのがエコトキシコゲノミクスの一般的なアプローチである（Lettieri, 2006; Snape et al., 2004）．遺伝子情報に乏しい生物にでも適用できる遺伝子発現解析手法がいくつか考案されており（Snape et al., 2004; Snell et al., 2003），それらの手法を用いてストレス応答遺伝子を同定することができる．また，全ゲノム解読を待たなくても，遺伝子の部分的な DNA 塩基配列情報が蓄積すれば DNA マイクロアレイによる網羅的な発現解析が行えるようになる．そのようなアプローチとして expressed sequence tag（EST）解析がある．EST は mRNA を鋳型として作られた相補的な配列を持つ DNA（complementary DNA: cDNA）の断片的塩基配列であり，EST 解析は発現している遺伝子の断片的な塩基配列をランダムに網羅的に決定していくというものである．

その他，遺伝子発現データと従来用いられてきた生存や繁殖などの生態毒性学パラメーターとの関連づけや，野外の個体群を解析対象とする場合，遺伝的変異の扱いも重要な課題である（Lettieri, 2006）．

以上に挙げた他，エコトキシコゲノミクスに関する様々な利点，利用法，問題点，解決策が議論されており，それらについては詳細なレビューが多方面でなされているのでそちらを参照されたい（Ankley et al., 2006; Bishop et al., 2001; Lettieri, 2006; Miracle and Ankley, 2005; 仲山 , 2006 ; Neumann and Galvez, 2002; Snape et al., 2004; Purohit et al., 2003; van Straalen, 2003）．

土壌動物のエコトキシコゲノミクスの現状

土壌には極めて多様な土壌動物が生息しており，身体の大きさから小型，中型，大型土壌動物と区分され，食性の違いによる機能の大別もそれに対応する（金子と伊藤，2004）．生態リスク評価を行うにはなるべく多くの機能群から研究対象とする生物を選ぶことが重要である．土壌動物では，センチュウ，ミミズ，トビムシに関してエコトキシコゲノミクスが開始されている．各分類群における研究の現状を，以下，順に紹介する．

センチュウは小型土壌動物に区分され，機能群は微生物食者に区分される．生物学全体のモデル生物として利用されおり，土壌性の *Caenorhabditis elegans*（Maupas）はゲノム解読が完了しており，さらに，土壌性に限らず数十種について EST 情報が蓄積されている（例えば http://www.

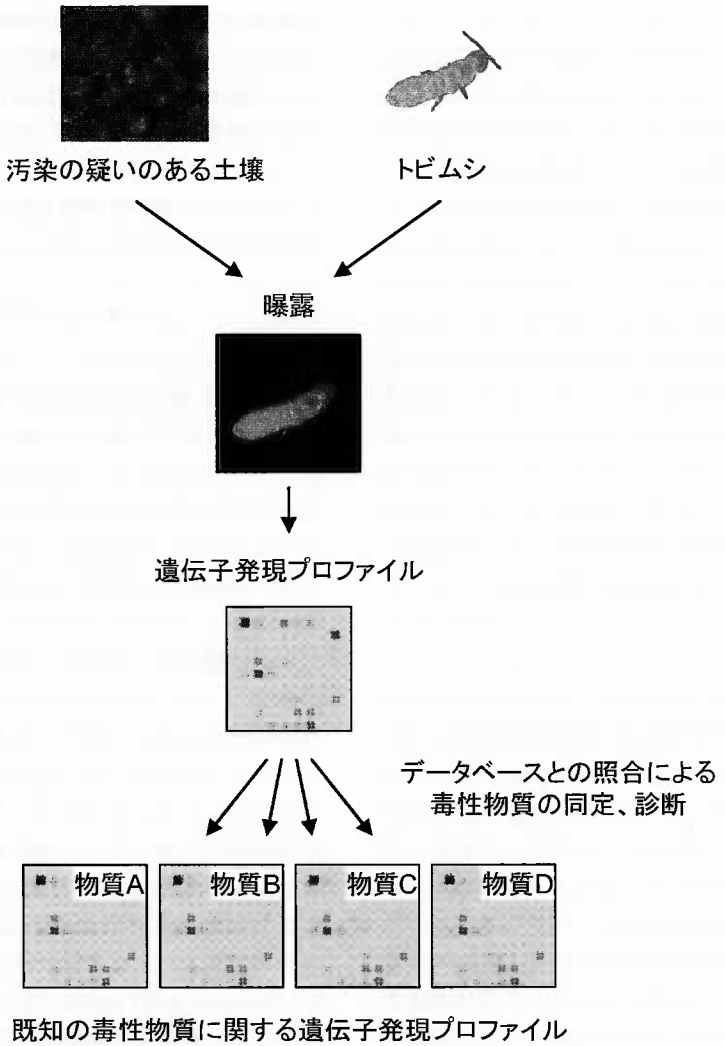

図 3. 生態リスク評価におけるエコトキシコゲノミクスの考えられる利用例—土壌汚染の診断.

汚染の疑いのある土壌を試験生物に曝露し，DNAマイクロアレイなどにより遺伝子発現プロファイルを得る．得られた発現プロファイルを，あらかじめ確立しておいた様々な汚染物質についての発現プロファイルのデータバンクと比較することで，汚染物質の同定などの診断が可能となる．また，発現プロファイルと個体群，群集，生態系レベルでの影響データをリンクさせることで，生態リスク評価が可能となる．あるいは，遺伝子発現を指標としたアッセイは初期段階のスクリーニングツールとして利用し，生態系レベルでの影響評価には別のアッセイを行うという階層的な生態リスク評価も可能である．van Straalen and Roelofs (2006) を改変.

nematodes.org/nembase3/index.shtml)．遺伝子の機能解析や毒性物質の作用様式の解明が進んでおり，DNAマイクロアレイを用いた発現解析も普通に行われている（有薗，2007)．多くの毒性評価試験が考案されており，近年，それらの試験を土壌生態リスク評価に適用するために，土壌を用いた試験の開発も行われるようになってきた (Sochová et al., 2006)．野外においては，指標生物化研究は活発に行われているが（岡田，2007)，ゲノミクスの適

用はこれからである．

ミミズは大型土壌動物に区分され，機能群は生態系改変者（土壌を摂食し土壌構造を改変し生態系機能に大きく影響する）と落葉変換者（落葉を摂食し，その過程で粉砕，圧縮などする）の両方に区分される．室内外の生態リスク評価研究に用いられてきている．毒性試験の標準化では進んでおり，*Eisenia fetida*（Savigny）と *E. andrei* Bouché を用いた致死や繁殖阻害を指標とした毒性試験が OECD により採択されている（Jänsch et al., 2005）．ゲノムは未解読であるが，近年，*Lumbricus rubellus* Hoffmeister と *E. andrei* に関する EST 情報が蓄積されてきており，データベース化されている（Stürzenbaum et al., 2003; http://www.earthworms.org/）．分子レベルのバイオマーカーの開発に向けて室内外で研究が行われており，バイオマーカーの反応と汚染物質の体内濃度の関係も調べられている（Sanchez-Hernandez, 2006）．また，*E. fetida* の DNA マイクロアレイを用いた研究も見られるようになってきた（Gong et al., 2007）．

トビムシは中型土壌動物に区分され，機能群は微生物食者と落葉変換者の両方に区分される．室内外の生態リスク評価研究に広く用いられてきており，毒性試験の標準化はミミズに次いで進められている（Jänsch et al., 2005）．ゲノムは未解読である．EST 情報は，センチュウやミミズほど多くはないが，データベースに蓄積されつつあり，バイオマーカーの開発が進められている．ゲノミックツールが野外汚染現場における進化生態学的研究にも適用されていることがトビムシの特徴であり，それらの成果は野生生物を用いたエコトキシコゲノミクスの限界と可能性を明らかにするものとして期待される．

その他の土壌動物についてもゲノムプロジェクトや EST プロジェクトが進行しており（http://www.genomesonline.org/），それらの成果がエコトキシコゲノミクスにも活用されることを期待する．

トビムシ

トビムシは体長 1 mm 前後の無翅の節足動物で，腹部後方にある跳躍器と呼ばれる器官を用いて跳ぶことができる．跳躍器を欠く種も多く，形態学的には腹部に腹管（あるいは粘管）と呼ばれる器官があることで特徴づけられる．昆虫のようでもあるが甲殻類のようでもあり，それらとの系統関係については議論の余地がある（Delsuc et al., 2003; Nardi et al., 2003a, b）．全世界で 6500 種（Hopkin, 1997），日本からは 380 種ほど報告されている（トビムシ研究会 , 2000）．ゲノムサイズに関する情報は *Orchesella cincta* L. について得られており，C 値（ゲノムあたりの DNA 量）は 0.23 pg である（T. Janssens, unpublished data in Animal Genome Size Database, http://www.genomesize.com/index.php）．染色体数は Kiauta（1970）によっていくつかの種について調べられている．トビムシは様々なタイプの土壌に生息しており（Hopkin, 1997），菌類やバクテリア，センチュウなどの微小生物を摂食し，アリやクモ，カエル，トリなどの多様な捕食生物のエサとなることで物質循環に関与している（Hopkin, 1997; 金田 , 2004）．

トビムシの生態毒性学

トビムシは分布が広く，土壌にごく普通に見い出されることから陸域の生態毒性学研究に広く用いられている．トビムシの生態毒性学的研究が最初に行われたのは，おそらく 1956 年で，DDT の毒性が試験された（Sheals, 1956）．その後も様々な環境汚染物質について研究が行われ，現在では，残留農薬，都市化，重金属，酸性雨，大気汚染，放射線など様々な人間活動の影響が調べられている（Hopkin, 1997）．影響を見るレベルも様々で，群集レベルの影響から，個体群，個体，分子レベルの影響まで調べられている（Fountain and Hopkin, 2004; Hopkin, 1997; Timmermans et al., 2005）．多様な種が研究対象とされてきており，そのなかでもとりわけ *Folsomia candida* Willem（図 1a）と *O. cincta*（図 1b）が活発に研究されている．

F. candida については，世界中に分布し，飼育が容易であり，単為生殖を行うために遺伝的に均一な個体群を得ることができることから，生態毒性学にとりわけ広く用いられてきており，国際的にも関心が高まってきている（Fountain and Hopkin, 2005; Hopkin, 1997; Jänsch et al., 2005）．生態リスク評価のための繁殖阻害を指標とした毒性試験が国際標準化機構（International Organization for Standardization: ISO）によりガイドライン化され（ISO, 1999），さらに現在，OECD におけるガイドライン化に向けた国際比較試験が行われ，日本からは著者の一人，金子が参加した．これらの流れを受けて，日本でも *F. candida* を用いた毒性試験が行われるようになってきた．Itoh et al.（1995）は日本産 *F. candida* の飼育個体群を確立し基礎的な飼育データを収集し，その個体群を用いて神谷ら（2004）は重油，Nakamori et al.（in press）は放射線の影響データを取得している．

ストレス応答遺伝子の同定

トビムシのエコトキシコゲノミクスは近年始まったばかりであるが，いくつかのストレス応答遺伝子の DNA 塩基配列情報が得られている．

メタロチオネインは，システインに富む金属結合性のタンパク質で，ヒトやセンチュウといった動物や，植物，菌類，バクテリアなど様々な生物から見つかっている．重金

属の解毒や排泄に関与していると考えられており，解毒および耐性機構の解明やカドミウム曝露のバイオマーカーとして利用の検討が進められている（Hensbergen et al., 2000; Quirós et al., 2007）．トビムシにおいては *O. cincta* からカドミウムに結合しているタンパク質が精製され，それをコードしている遺伝子の DNA 塩基配列が決定された（Hensbergen et al., 1999; 2001）．他の生物と塩基配列を比較したところ，トビムシのメタロチオネインはショウジョウバエのものよりもヒトのものと相同性が高いことが示された（Hensbergen et al., 1999）．

O. cincta のメタロチオネイン遺伝子について，カドミウム曝露における，発現の用量依存性と体内の発現部位も明らかにされている（Hensbergen et al., 2000）．餌中のカドミウム濃度の増加にともない発現量が増加し，1.0μmol Cd/g dry food でプラトーになることが示された．メタロチオネイン遺伝子の発現部位は腸に限局しており，カドミウムも腸に局在していることが示された．

メタロチオネイン遺伝子以外にもそれと相同性の高い遺伝子の存在が *O. cincta* において示唆されている（Roelofs et al., 2006）．その他，*O. cincta* においてカドミウム曝露により発現量が変動する遺伝子として，ショウジョウバエで知られている croquemort（マクロファージがアポトーシスを起こした細胞を認識し捕食するのを介在する受容体タンパク質）遺伝子に類似した遺伝子など，20 の遺伝子が suppression subtractive hybridization（SSH）法などにより分離され，その機能の推定がなされている（Roelofs et al., 2007）．

タンパク質のアミノ酸配列は生物種間で保存性が高い場合がある．したがって，他の生物で用いられる抗体を用いて，タンパク質の発現変動を捉えることも可能である．Ke et al.（2004）は，ストレスの情報伝達に関与する酵素群である mitogen-activated protein kinase（MAPK）ファミリーの 3 種の抗体を *Onychiurus yodai* Yosii に適用し，それらの酵素がトビムシにも存在し，酸性条件で発現誘導されることを示した．このことは MAPK ファミリーの遺伝子が *O. yodai* にも存在することを示唆している．

重金属耐性に関わる遺伝子

メタロチオネインとカドミウム耐性の関係を明らかにするために，*O. cincta* のカドミウム耐性個体群（カドミウム汚染区由来）とレファレンス個体群（非汚染区由来）の 2 つの飼育個体群間で，メタロチオネイン遺伝子の発現量が比較された（Sterenborg and Roelofs, 2003）．定常状態では汚染区の個体群のほうが発現量は高かったものの有意差はなかった．一方，カドミウム曝露後（1μmol Cd/g food, 7 日間）の発現量の増加は耐性個体群で有意に高かった（耐性個体群，2.4–7.8 倍；レファレンス個体群，1.5–2.4 倍）．両個体群に，メタロチオネイン遺伝子のコード領域に塩基配列の変異は見られず，また，ゲノム上にメタロチオネイン遺伝子の反復がないことも確認された．以上のことから，カドミウム耐性は，曝露時においてメタロチオネイン遺伝子発現量が高い表現型の選択による結果であると考えられた．

トビムシは生涯脱皮を繰り返し，脱皮サイクルごとに腸の表皮細胞を更新し，その過程で古い腸表皮細胞と一緒にそこに保有されていたカドミウムなどの重金属を排泄する（Crommentuijn et al., 1994; Joosse and Buker, 1979）．つまり，トビムシにおけるカドミウム排泄効率は腸表皮細胞のカドミウム保有機能に依存する．メタロチオネインが多く発現すれば，腸表皮細胞のカドミウム保有力が増加しカドミウムの排泄効率が増し，耐性が高まるものと考えられる．

亜鉛との競合下におけるメタロチオネイン遺伝子の発現も *O. cincta* において調べられている（Sterenborg et al., 2003）．亜鉛はカドミウムの吸収は阻害するものの，メタロチオネインの発現を誘導せず，また，カドミウムにより誘導されたメタロチオネインと結合せず，体内でのカドミウム排泄には影響しない．

メタロチオネイン遺伝子の発現量の変異をもたらす要因として，プロモーター領域（転写開始を調節する領域）の変異が着目された．*O. cincta* においてメタロチオネイン遺伝子のプロモーター領域に 9 種類のアレル（allele：同じ領域における塩基配列の変異型）が見つかり（Janssens et al., 2007），このうち 8 種類のアレルの種類とメタロチオネイン遺伝子発現量の関係が調べられた（Roelofs et al., 2006）．メタロチオネイン遺伝子の発現量でトビムシをグループ分けし，そのグループ内の 8 種類のアレルの存在頻度を比較したところ，そのうち 3 種のアレルはメタロチオネイン発現量の多いグループで見られる頻度が高くなる傾向が見られた．このことから，メタロチオネイン遺伝子発現量における遺伝的な変異は，プロモーター領域にある発現調節に関わる領域における変異により部分的に説明された．

メタロチオネイン以外にもカドミウム耐性に関与する要因があることが，*O. cincta* において示唆されている（Timmermans et al., 2005）．例えば，カドミウム耐性個体群とレファレンス個体群では，カドミウムの排泄効率や成長阻害感受性が遺伝的に異なっており，繁殖開始時期などの生活史パラメーターも異なっている（Posthuma et al., 1993）．

Roelofs et al.（2007）は分子レベルでの様々な耐性要因

の解明に向けて，*O. cincta* のカドミウム耐性に関わる遺伝子の探索を行った．カドミウム曝露により発現が変動するいくつかの遺伝子について，耐性の異なる3個体群（非汚染区由来の1個体群と汚染区由来の2個体群）でカドミウム曝露（114μg Cd/g food，2日間）による発現変動を調べたところ，細胞シグナリングやアポトーシスなどに関わる遺伝子と相同性の高い7つの遺伝子（メタロチオネイン遺伝子を含む）が，いずれかの個体群で有意な変動を示した．メタロチオネイン遺伝子はいずれの個体群でも曝露により発現上昇したが，他の遺伝子は個体群によって異なった発現変動を示した．なかでも，croquemort 遺伝子と glucose dehydrogenase 遺伝子に関しては，レファレンス個体群では発現が誘導されたのに，耐性個体群では逆に抑制された．変動した遺伝子数でみると，レファレンス個体群のほうが多かった．一方，カドミウム曝露によってレファレンス個体群で発現が上昇する6遺伝子について，定常状態での発現量を両個体群間で比較すると，耐性個体群のほうが高かった．したがって，レファレンス個体群においてカドミウム曝露に応答して発現するこれらの遺伝子は，耐性個体群においては常時発現することでカドミウムの解毒・排泄の効率を高めている可能性があると推察された．

カドミウム汚染耐性の進化と遺伝子発現

メタロチオネイン遺伝子の発現に関して遺伝的な研究が行われている．Roelofs et al.（2006）は，非汚染区由来の *O. cincta* 飼育個体群を用いてメタロチオネイン遺伝子の発現量の遺伝率（ある形質についての親と子の相関関係；例えば，耐性の高い親ほど耐性の高い子を産むかどうか）を調べた．野外から採集してきた野生個体群（第0世代）から確立した室内飼育個体群を親（第1世代）とし，その次世代の個体群を子（第2世代）とした．全個体，7週齢になった時点でカドミウム曝露時（0.5μmol Cd/g dry food, 2日間）と平常時の遺伝子発現量を測定し，親子（第1–2世代）間の遺伝率を計算したところ，遺伝率は曝露時のみ有意となり，曝露時のメタロチオネイン遺伝子発現量という形質は遺伝することが示唆された．このことから，選択は平常時の発現量に働くものではなく，曝露時の発現の促進に働くものであることが示唆された．この曝露時の発現量は量的遺伝形質であり，複数の遺伝子が関与していることも示された．また，メタロチオネイン遺伝子発現の遺伝率は，上記個体群と由来が同じ個体群で測定されたカドミウム排泄効率の遺伝率（Posthuma et al., 1993）に匹敵するものであった．

O. cincta のカドミウム汚染区由来のカドミウム耐性個体群と非汚染区由来のレファレンス個体群では，カドミウム曝露時のメタロチオネイン遺伝子の発現量は異なっている（Sterenborg and Roelofs, 2003）．この形質はカドミウム耐性に関連し，かつ，遺伝することから，この両個体群間のメタロチオネイン遺伝子の発現量の違いはカドミウム汚染によりもたらされた適応進化によるもである可能性がある（Roelofs et al., 2006）．

Timmermans et al.（2005）は野外における進化の検出を試みるために，カドミウム汚染区と非汚染区由来の合計17の *O. cincta* 飼育個体群を用いて，メタロチオネイン遺伝子発現量，カドミウム耐性，およびカドミウム汚染濃度の関係を調べた．定常状態ではメタロチオネイン遺伝子発現量と野外カドミウム汚染濃度（CaCl2 抽出物；一般に生物によって吸収可能な化学形態の元素が溶出すると考えられている）の間に正の相関が見られたが，カドミウム曝露後（110μg Cd/g food, 2日間）の発現量では野外汚染濃度と相関が見られなかった．この結果は，メタロチオネインは初期の耐性獲得の要因となるが，メタロチオネイン以外にも耐性に関与する要因があることを示唆している．

一方，カドミウム耐性と野外汚染濃度の間で有意な相関は得られなかった（Timmermans et al., 2005）．2個体群の比較ではカドミウム汚染によるカドミウム耐性の適応進化が起こっていると考えられたが（Sterenborg and Roelofs, 2003），17の個体群を比較した場合，かならずしもそのような現象は観察されず，いくつかの汚染区由来の個体群は非汚染区由来の個体群より耐性が低かった（Timmermans et al., 2005）．このように，野外では進化の検出が困難な場合が多い s．野外の *O. cincta* 個体群では遺伝子の流入が起こっていると推察されており（Frati et al., 1992; van der Wurff et al., 2003），それが野外での進化の検出を困難にしている要因の一つとして推察されている（Timmermans et al., 2005, 2007b）．

Timmermans et al.（2007b）はさらに，メタロチオネイン遺伝子プロモーター領域のアレルの頻度を指標として *O. cincta* における野外での進化の検出を試みた．先に述べたとおり，メタロチオネイン遺伝子発現量の遺伝的な変異には，プロモーター領域のアレルが関与していることが示されている（Janssens et al., 2007; Roelofs et al., 2006）．合計15の耐性個体群とレファレンス個体群における8種類のアレルの存在頻度を調べたところ，耐性個体群とレファレンス個体群の間でアレルの存在頻度に有意差がみられ，2種のアレルについては汚染程度と頻度に正の相関関係が得られた．この2種の変異型はメタロチオネイン発現量の多いグループで高頻度に見られるものであった（Roelofs et al., 2006）．このように，カドミウム耐性に関わるメタロチオネイン遺伝子の発現量を左右するアレルの頻度に，重金属汚染による選択が野外で働いていることが示唆された．野外における進化は，カドミウム耐性という表現型を

指標とした場合，検出困難であったが，アレルの頻度という分子レベルの指標を用いることで検出された．

トビムシの EST データベース Collembase

オランダの Vrije 大学の研究グループは Collembase というトビムシの EST データベース（Timmermans et al., 2007a; http://www.collembase.org/index.html）の構築を進めており，*F. candida* と *O. cincta* の定常状態やフェナントレン（多環芳香族炭化水素の一種）やカドミウム曝露状態で発現する遺伝子の EST 情報が蓄積されつつある．それと平行して *F. candida* の DNA マイクロアレイの開発が進められており，汚染物質の同定など生態リスク評価における診断的な利用が検討されている（図 3; Timmermans et al., 2007a; van Straalen and Roelofs, 2006; van Straalen et al., 2007）．*F. candida* は室内の毒性試験によく用いられてきており，毒性データも蓄積しているので，遺伝子発現のデータと毒性データとの関連付けも促進されると期待される．

HiCEP 法によるストレス応答遺伝子のスクリーニング

独立行政法人放射線医学総合研究所で独自に開発された高カバー率発現プロファイリング（high-coverage expression profiling: HiCEP）と呼ばれるツールは，遺伝子の塩基配列情報がなくても真核生物であればどの生物でも網羅的な遺伝子発現解析ができるというユニークなものである（安倍他，2003; Fukumura et al., 2003）．最近では，試料の加工によって真核細胞に限らず原核生物への適用にも成功している（Mitani et al., 2006）．原理は mRNA から合成した cDNA を制限酵素（DNA の特定の塩基配列を認識して切断する酵素）で切断し，その長さで遺伝子の種類を区別して定量するものである（図 4; 安倍他，2003; Fukumura et al., 2003）．HiCEP 法によって不特定多数の遺伝子の発現プロファイリング解析を網羅的に行った後，発現変動の大きい少数の遺伝子の配列を決定するだけでも，これらの遺伝子に機能的な共通点が見いだされ，これまで明らかでなかった生物応答が推測できた例がある（Fujimori et al., 2005）．

HiCEP 法は，トビムシのようなゲノミックモデル実験生物でない生物を研究対象とする生態毒性学において利用価値が高い．著者らは HiCEP 法を用い，*F. candida* における放射線曝露のバイオマーカーとなるような，線量依存的に発現量が増加する遺伝子の探索を開始している（図 4; 中森他，未発表）．段階的な異なる線量の放射線を照射したトビムシの遺伝子発現プロファイリングを HiCEP 法により行い，2 万種近くの発現遺伝子の中からバイオマーカーの候補となる遺伝子をいくつか見出すことに成功している．さらに，他の環境ストレスについても同様の解析を行い，ストレッサー特異的な応答遺伝子の探索も開始している．

おわりに

エコトキシコゲノミクスの潜在的利点に関心が集まっており，トビムシにおいては，野外では *O. cincta*，室内では *F. candida* を用いて研究が進められていることを述べた．*O. cincta* における遺伝子発現レベルの進化に関する研究で得られた知見は，ゲノミックツールを野外個体群を用いた環境汚染のモニタリングに適用する際の問題や可能性を示す重要な情報となるだろう．例えば，進化速度の速い生物においては，汚染による進化にともない遺伝子発現パターンが変化している可能性があり，遺伝子発現量やその応答をそのまま環境汚染の指標とするには問題があり注意が必要であることがわかる．逆に，進化の程度を調べることで，その場所の汚染の経緯を探ることが可能かもしれない．一方，*F. candida* の DNA マイクロアレイの開発は室内の毒性試験を診断的な生態リスク評価に利用可能にするものとして期待される．また，EST データベース Collembase はトビムシのゲノミクスを促進するものである．これらの研究活動はまだ始まったばかりであるが，今後のトビムシのエコトキシコゲノミクスの発展に寄与するものである．

エコトキシコゲノミクスの利点はいまだ潜在的なものが多く，実用化に向けては検証が必要である．分子レベルのデータを蓄積し，それをさらに毒性データや，分析データとリンクさせ，生態系（より具体的には生態系が人類にもたらしてくれる恩恵）の保護に生かしていくためには多くの課題が残されている．

謝　辞

本研究の一部は環境省による放射線医学総合研究所への委託研究（地球環境保全等試験研究「高精度遺伝子発現プロフィール比較解析に基づく多様な環境有害物質の相対リスク評価手法の開発に関する研究」）によるものである．独立行政法人放射線医学総合研究所理事長調整費による HiCEP 解析ユニットには，プロファイリング解析をしていただいた．吉田聡博士（独立行政法人放射線医学総合研究所）には，本稿をまとめるにあたり協力いただいた．Nico M. van Straalen 博士（Vrije 大学），神谷貴文博士（独立行政法人産業技術総合研究所），および中島徹夫博士（独立行政法人放射線医学総合研究所）には，それぞれ，*O. cincta*，*F. candida*，および DNA マイクロアレイの写真を提供していただいた．ここに記して感謝する．

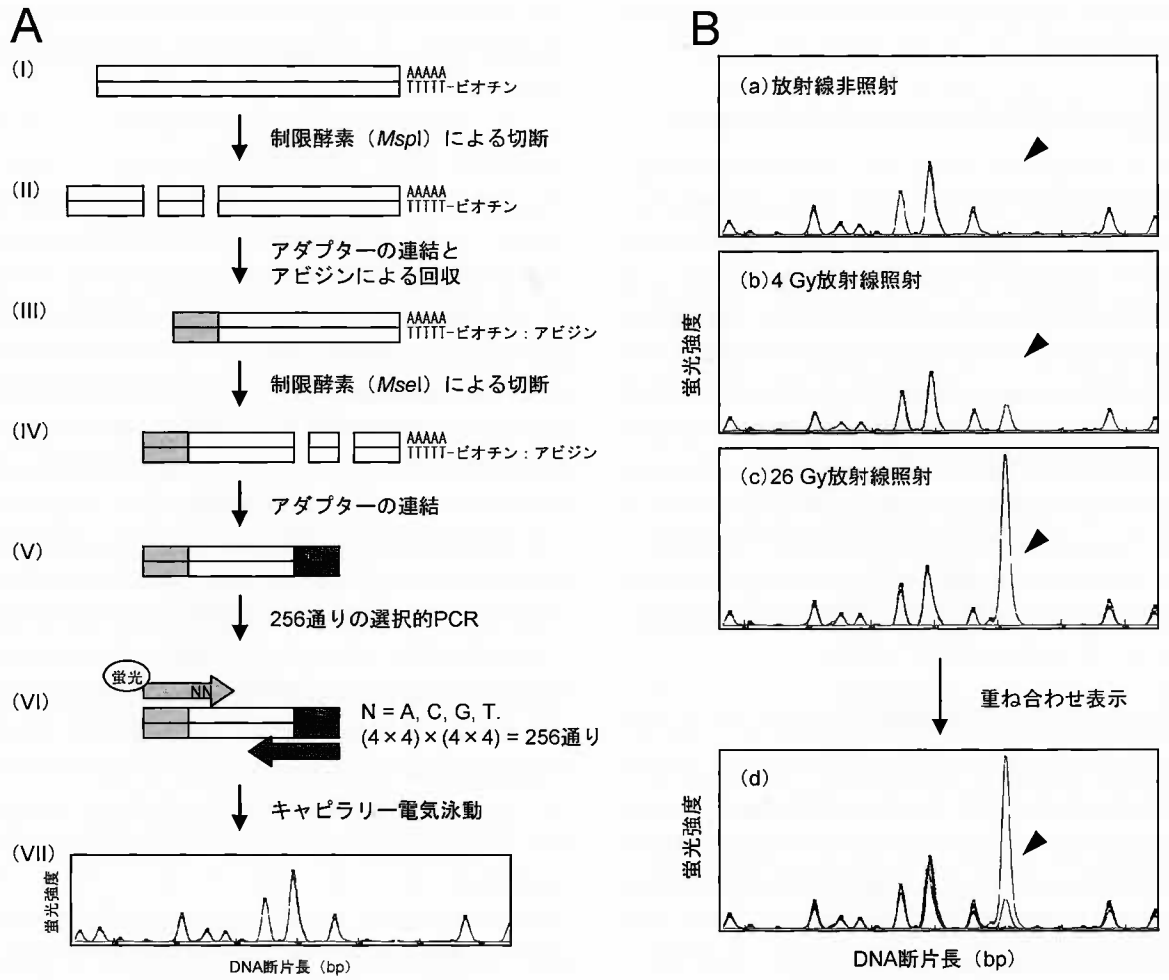

図 4. 高カバー率発現プロファイリング（high-coverage expression profiling: HiCEP）解析の概略とストレス応答遺伝子探索における利用例.

A. HiCEP解析の概略(ステップI-VII). (I)サンプルからRNAを抽出し，ビオチンを付加したオリゴdTプライマー（真核生物のmRNAに付加されるポリアデニンと結合するチミンが連なったプライマー）を用いてRNAから二本鎖の相補的DNA（complementary DNA: cDNA；白色棒）を合成する．(II) 二本鎖cDNAを4塩基認識の制限酵素（DNAの特定の塩基配列を認識して切断する酵素；*Msp*I）によって消化する．(III) 消化によって生じるDNA断片の末端にアダプター（淡灰色棒）を結合し，ポリアデニン側の断片のみをアビジン（ビオチンに対し親和性を持つ）を用いて回収する．(IV) 回収したDNA断片を別の4塩基認識の制限酵素（*Mse*I）で消化する．(V) 消化によって生じるDNA断片の新たな末端に別のアダプター（濃灰色棒）を結合する．このようにして，両末端に異なるアダプターを有するDNA断片が各遺伝子につき1種類得られる．(VI) これらのDNA断片をアダプターとその内側2塩基の配列をもつプライマーを用いた256通りの選択ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction: PCR）でサブグループ化（これにより，後のDNA断片長による分離を容易にする）して増幅し，同時にその増幅産物を蛍光標識する．(VII) これらのPCR産物中のDNA断片を，キャピラリー電気泳動にて長さごとに分離し，蛍光強度により発現量検出する．各遺伝子はDNA断片長により区別されるので，解析前に塩基配列データを必要としない．そのため，ゲノム情報のない環境生物にも適用可能である．A，アデニン；C，シトシン；G，グアニン；T，チミン．Fukumura *et al.* (2003) を改変．B. HiCEP法を用いたトビムシ（*Folsomia candida*）における放射線応答遺伝子の探索例．(a)，放射線が照射されていないトビムシのプロファイル；(b)，4 Gyの放射線が照射されたトビムシのプロファイル；(c)，26 Gyの放射線が照射されたトビムシのプロファイル；(d)，a–cの重ね合わせ表示．HiCEP法により波形データとして得られるプロファイルは同一サンプルでは重なり合う（a–c）．そのため，異なるサンプルのプロファイルを重ね合わせることで，サンプル間で発現量が異なる遺伝子を検出できる（d）．矢頭；処理間で発現量が異なる遺伝子を示すピーク．

摘 要

ゲノミクスと呼ばれるゲノムの構造と機能に関する研究で用いられる手法を生態毒性学に適用した研究は，エコトキシコゲノミクスとして知られている．エコトキシコゲノミクスは，汚染物質の診断など，様々な用途において潜在的利点を有しており，関心を集めている．トビムシにおいては，遺伝子情報に乏しいため，遺伝子を同定しその特徴を把握することが先決である．野外では *Orchesella cincta*，室内では *Folsomia candida* を用いてエコトキシコゲノミクス研究が進められている．*O. cincta* においては金属結合性タンパク質メタロチオネインの遺伝子が同定され，野外における転写制御の進化が示された．*F. candida* は室内の毒性試験によく用いられる種であり，本種においてはDNAマイクロアレイを用いた土壌生態リスク評価手法の開発が進められており，Collembaseと呼ばれるトビムシのexpressed sequence tag（EST）のデータベースの構築が *O. cincta* も対象に含めてオランダのVrije大学の研究グループにより進められている．著者らはHigh-Coverage Expression Profiling（HiCEP）と呼ばれる手法を用いて *F. candida* におけるストレス応答遺伝子の探索を開始している．これらの研究活動は始まったばかりであるが，今後のトビムシの生態毒性学に大きな進展をもたらすものと期待される．

文 献

安倍真澄・福村龍太郎・高橋宏和・中原麻希・斎藤俊行・藤森亮・ 荒木良子，2003． 次世代遺伝子発現プロフィール解析法．未知遺伝子，未知転写物の検出．蛋白質・核酸・酵素，48: 1443–1449.

Afshari, C. A., Nuwaysir, E. F. and Barrett, J. C., 1999. Application of complementary DNA microarray technology to carcinogen identification, toxicology, and drug safety evaluation. Cancer Research, 59: 4759–4760.

Ankley, G. T., Daston, G. P., Degitz, S. J., Denslow, N. D., Hoke, R. A., Kennedy, S. W., Miracle, A. L., Perkins, E.J., Snape, J., Tillitt, D.E., Tyler, C. R. and Versteeg, D., 2006. Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology. Environmental Science & Technology, 40: 4055–4065.

青木淳一，1973．土壌動物学．北隆館，東京．

有薗幸司，2007． 線虫マイクロアレイを用いた環境化学物質のバイオアッセイ．細胞工学，26: 1408–1411.

有薗幸司・冨永伸明，2005． エコトキシコゲノミクス：種間外挿の展望—センチュウを中心として．医学のあゆみ，213: 249–254.

Bishop, W. E., Clarke, D. P. and Travis, C. C., 2001. The genomic revolution: what does it mean for risk assessment? Risk Analysis, 21: 983–987.

Crommentuijn, T., Doodeman, C. J. A. M., Doornekamp, A., van der Pol, J. J. C., Bedaux, J. J. M. and van Gestel, C. A. M., 1994. Lethal body concentrations and accumulation patterns determine time-dependent toxicity of cadmium in soil arthropods. Environmental Toxicology and Chemistry, 13: 1781–1789.

Delsuc, F., Phillips, M. J. and Penny, D., 2003. Comment on "Hexapod origins: Monophyletic or paraphyletic?" Science, 301: 1482d.

Di Toro, D. M., Allen, H. E., Bergman, H. L., Meyer, J. S., Paquin, P. R. and Santore, R. C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. Environmental Toxicology and Chemistry, 20: 2383–2396.

Fountain, M. T. and Hopkin, S. P., 2004. A comparative study of the effects of metal contamination on Collembola in the field and in the laboratory. Ecotoxicology, 13: 573–587.

Fountain, M. T. and Hopkin, S. P., 2005. *Folsomia candida* (Collembola): a "standard" soil arthropod. Annual Review of Entomology, 50: 201–222.

Frati, F., Fanciulli, P. P. and Posthuma, L., 1992. Allozyme variation in reference and metal-exposed natural populations of *Orchesella cincta* (Insecta: Collembola). Biochemical Systematics and Ecology, 20: 297–310.

Fujimori, A., Okayasu, R., Ishihara, H., Yoshida, S., Eguchi-Kasai, K., Kojima, K., Ebisawa, S. and Takahashi, S., 2005. Extremely low dose ionizing radiation up-regulates CXC chemokines in normal human fibroblasts. Cancer Research, 65: 10159–10163.

Fukumura, R., Takahashi, H., Saito, T., Tsutsumi, Y., Fujimori, A., Sato, S., Tatsumi, K., Araki, R., Abe, M., 2003. A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts. Nucleic Acids Res. 31, e94.

Gerstein, M. B., Bruce, C., Rozowsky, J. S., Zheng, D., Du, J., Korbel, J. O., Emanuelsson, O., Zhang, Z. D., Weissman, S. and Snyder, M., 2007. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. Genome Research, 17: 669–681.

Gong, P., Guan, X., Inouye, L. S., Pirooznia, M., Indest, K. J., Athow, R. S., Deng, Y. and Perkins, E. J., Toxicogenomics analysis provides new insights into molecular mechanisms of the sublethal toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene in *Eisenia fetida*. Environmental Science & Technology, 41: 8195–8202.

Hensbergen, P.J., Donker, M.H., van Velzen, M. J. M., Roelofs, D., van der Schors, R. C., Hunziker, P. E. and van Straalen, N. M., 1999. Primary structure of a cadmium-induced metallothionein from the insect *Orchesella cincta* (Collembola). European Journal of Biochemistry, 259: 197–203.

Hensbergen, P. J., van Velzen, M. J. M., Nugroho, R. A., Donker, M. H. and van Straalen, N. M., 2000. Metallothionein-bound cadmium in the gut of the insect *Orchesella cincta* (Collembola) in relation to dietary cadmium exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 125: 17–24.

Hensbergen, P. J., Donker, M. H., Hunziker, P. E., van Schors, R. C. and van Straalen, N. M., 2001. Two metal-binding peptides from the insect Orchesella cincta (Collembola) as a result of metallothionein cleavage. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 31: 1105–1114.

Hopkin, S. P., 1997. Biology of the Springtails (Insecta: Collembola). Oxford Univ. Press, Oxford.

ISO, 1999. Soil quality — Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants, No. 11267, ISO, Geneva.

Itoh, R., Hisamatsu, M., Matsunaga, M. and Hishida, F., 1995. Growth and reproduction of a collembolan species, *Folsomia candida* (Willem), under experimental conditions. Journal of the College of Arts & Sciences, Showa University, 26: 23–30.

Janssens, T. K. S., Mariën, J., Cenijn, P., Legler, J., van Straalen, N.M. and Roelofs, D., 2007. Recombinational micro-evolution of functionally different metallothionein promoter alleles from *Orchesella cincta*. BMC Evolutionary Biology, 7: 88.

Jänsch, S., Amorim, M. J. and Römbke, J., 2005. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environmental Reviews, 13: 51–83.

Joosse, E. N. G. and Buker, J. B., 1979. Uptake and excretion of lead by litter-dwelling Collembola. Environmental Pollution, 18: 235–240.

神谷貴文・金子信博・丹羽尚志・前田浩之助. 2004. 生態学的視点による重油汚染土壌の回復状況調査. Edaphologia, 75: 1–9.

金田哲, 2004. トビムシと微生物のリンク. 日本生態学会誌 , 54: 217–225.

金子信博・久松真紀子・中西準子, 2001. 土壌汚染による土壌動物に関する生態リスクの解析. Edaphologia, 67: 1–14.

金子信博・伊藤雅道, 2004. 土壌動物の生物多様性と生態系機能. 日本生態学会誌 , 54: 201–207.

Ke, X., Yang, Y., Yin, W., Xue, L., 2004. Effects of low pH environment on the collembolan *Onychiurus yaodai*. Pedobiologia 48, 545–550.

Kiauta, B., 1970. Review of the germ cell chromosome cytology of Collembola, with a list of chromosome numbers and data on two species new to cytology. Genen en Phaenen, 4: 89–99.

Kille, P., Small, G., Spurgeon, D., Tyler, C., Pickford, D. and Snape, J., 2003. Environmental Genomics — An Introduction. Environment Agency, Bristol.

Lettieri, T., 2006. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. Environmental Health Perspectives, 114: 4–9.

Mattingly, C. J., Rosenstein, M. C., Davis, A. P., Colby, GT, Forrest, J. N. Jr and Boyer, J. L., 2006. The Comparative Toxicogenomics Database: a cross-species resource for building chemical-gene interaction networks. Toxicological Sciences, 92: 587–595

McKusick, V. A., 1997. Genomics: structural and functional studies of genomes. Genomics, 45: 244–249.

森千里, 2005. ヒト臍帯のトキシコゲノミクス—胎児の複合曝露影響におけるハイリスク・グループに着目した新しいリスクアセスメントの開発. 医学のあゆみ, 213: 243–247.

Miracle, A. L. and Ankley, G. T., 2005. Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants of fish. Reproductive Toxicology, 19: 321–326.

Mitani, Y., Suzuki, K., Kondo, K., Okumura, K. and Tamura, T., 2006. Gene expression analysis using a modified HiCEP method applicable to prokaryotes: A study of the response of *Rhodococcus* to isoniazid and ethambutol. Journal of Biotechnology, 123: 259–272.

Nakamori, T., Yoshida, S., Kubota, Y., Ban-nai, T., Kaneko, N., Hasegawa M. and Itoh, R., in press. Effects of acute gamma irradiation on *Folsomia candida* (Collembola) in a standard test. Ecotoxicology and Environmental Safety, doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.10.029.

仲山慶, 2006. トキシコゲノミクスによる POPs 等有害化学物質の生態影響評価. 環境毒性学会誌 , 9: 81–86.

Nardi, F., Spinsanti, G., Boore, J. L., Carapelli, A., Dallai, R. and Frati, F., 2003a. Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? Science, 299: 1887–1889.

Nardi, F., Spinsanti, G., Boore, J. L., Carapelli, A., Dallai, R. and Frati, F., 2003b. Response to comment on "Hexapod origins: Monophyletic or paraphyletic?" Science, 301: 1482e

Neumann, N. F. and Galvez, F., 2002. DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? Biotechnology Advances, 20: 391–419.

OECD, 2005. Report of the OECD/IPCS Workshop on Toxicogenomics; OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 50, April 2005.

岡田浩明，2007．線虫群集を利用して土壌の健康度を評価する．化学と生物，45: 43–50.

Pearson, H., 2006. What is a gene? Nature, 441: 399–401.

Posthuma, L., Hogervorst, R. F., Joosse, E. N. G. and van Straalen, N. M., 1993. Genetic variation and covariation for characteristics associated with cadmium tolerance in natural populations of the springtail *Orchesella cincta* (L.). Evolution, 47: 619–631.

Purohit, H. J., Raje, D. V., Kapley, A., Padmanabhan, P. and Singh, R., 2003. Genomics tools in environmental impact assessment. Environmental Science & Technology, 37: 356A–363A.

Quirós, L., Piña, B., Solé, M., Blasco, J., López, M. A., Riva, M. C., Barceló, D. and Raldúa, D., 2007. Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: laboratory and field studies. Chemosphere, 67: 1144–1154.

Roelofs, D., Mariën, J. and van Straalen, N. M., 2007. Differential gene expression profiles associated with heavy metal tolerance in the soil insect *Orchesella cincta*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37: 287–295.

Roelofs, D., Overhein, L., de Boer, M.E., Janssens, T. K. S. and van Straalen, N. M., 2006. Additive genetic variation of transcriptional regulation: metallothionein expression in the soil insect *Orchesella cincta*. Heredity, 96: 85–92.

Sanchez-Hernandez, J. C., 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. Reviews of Environmental Contamination & Toxicology, 188: 85–126.

Schulze, A. and Downward, J. 2001. Navigating gene expression using microarrays — a technology review. Nature Cell Biology, 3: E190–E195.

Sheals, J. G., 1956. Soil population studies I. The effects of cultivation and treatment with insecticides. Bulletin of Entomological Research, 47: 139–152.

Snape, J. R., Maund, S. J., Pickford, D. B. and Hutchinson, T. H., 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. Aquatic Toxicology, 67: 143–154.

Snell, T. W., Brogdon, S. E. and Morgan, M. B., 2003. Gene expression profiling in ecotoxicology. Ecotoxicology, 12: 475–483.

Sochová, I., Hofman, J. and Holoubek, Ivan., 2006. Using nematodes in soil ecotoxicology. Environment International, 32: 374–383.

Sterenborg, I. and Roelofs, D., 2003. Field-selected cadmium tolerance in the springtail *Orchesella cincta* is correlated with increased metallothionein mRNA expression. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33: 741–747.

Sterenborg, I., Vork, N. A., Verkade, S. K., van Gestel, C. A. M. and van Straalen, N. M., 2003. Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail, *Orchesella cincta*. Environmental Toxicology and Chemistry, 22: 1167–1171.

Stürzenbaum, S. R., Parkinson, J., Blaxter, M., Morgan, A. J., Kille, P. and Georgiev, O., 2003. The earthworm Expressed Sequence Tag project. Pedobiologia, 47: 447–451.

Timmermans, M. J. T. N., Ellers, J., Roelofs, D. and van Straalen, N. M., 2005. Metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in metal-stressed and reference populations of the springtail *Orchesella cincta*. Ecotoxicology, 14: 727–739.

Timmermans, M. J. T. N., de Boer, M. E., Nota, B., de Boer T. E., Mariën, J., Klein-Lankhorst, R. M., van Straalen, N. M. and Roelofs, D., 2007a. Collembase: a repository for springtail genomics and soil quality assessment. BMC Genomics, 8:341.

Timmermans, M. J. T. N., Ellers, J. and van Straalen, N. M., 2007b. Allelic diversity of metallothionein in *Orchesella cincta* (L.): traces of natural selection by environmental pollution. Heredity, 98: 311–319.

トビムシ研究会，2000．日本産トビムシ和名目録. Edaphologia, 66: 75–88.

U. S. Environmental Protection Agency, 2004. Potential Implications of Genomics for Regulatory and Risk Assessment Applications at EPA. EPA 100/B-04/002.

van der Wurff, A. W. G., Isaaks, J. A., Ernsting, G. and van Straalen, N. M., 2003. Population substructures in the soil invertebrate *Orchesella cincta*, as revealed by

microsatellite and TE-AFLP markers. Molecular Ecology, 12: 1349–1359.

van Straalen, N. M., 2003. Ecotoxicology becomes stress ecology. Environmental Science & Technology, 37: 324A–330A.

van Straalen, N. M. and Roelofs, D., 2006. An Introduction to Ecological Genomics. Oxford University Press, Oxford.

van Straalen, N. M., Roelofs, D., Timmermans, M. J. T .N., Mariën, J., Janssens, T. K. S., de Boer, M. E., Nota, B. and de Boer, T.E., 2007. Genome-wide gene expression changes in response to heavy metal exposure. In: Biogeochemistry of Trace Elements: Environmental Protection, Remediation and Human Health. (eds. Y.G. Zhu, N. Lepp and R. Naidu), pp 3–4. Tsinghua University Press, Bei Jing.

若林朋子，1998．エコトキシコロジーとその周辺 13．構造活性相関（その 1）．環境管理，34: 493–498.

渡邉肇，2006．トキシコゲノミクスからエコトキシコゲノミクスへの展開．日本比較内分泌学会ニュース，121: 21–26.

渡邉肇・井口泰泉，2005．トキシコゲノミクスのニューパラダイム．医学のあゆみ，213: 237–241.