

助成番号 0719

ミジンコを利用した貧塩適応の分子機構に関する研究 — 貧塩環境応答遺伝子の探索 —

細井 公富, 伴 修平

滋賀県立大学環境科学部

概要【目的】 水圏生物にとって種々の塩類の濃度は、重要な環境要因の一つである。高塩分環境への耐性・適応については、種々の生物において個体レベルから細胞・分子レベルに至る非常に多くの研究例がある反面、低塩分環境に対する生物の耐性や適応機構については、汽水域に生息する生物や、河川と海洋を行き来する通し回遊魚等限られた種の研究をのぞいて、その研究数は極端に少ない。しかし、生物の進化と現在の生物の生息環境を塩分の観点からとらえると、その進化の過程において、環境中に豊富な塩類を含有する海洋から、塩類の乏しい淡水域への進出の過程で、塩類を貯蔵・確保する必要が生じ、その機能を進化させてきたと考えられる。したがって、淡水性の生物には貴重な塩類を有効に利用するための種々の機能が備わっていると考えられる。本研究では、実験動物学的知見の蓄積が豊富な淡水性甲殻類オオミジンコ *Daphnia magna* を用いて、分子生物学的手法により塩類の乏しい環境への適応を通じて獲得した貧塩適応機能を明らかにすることを目的として、オオミジンコを貧塩環境に暴露し、それに応答して発現する遺伝子群の単離および機能同定を行った。

【方法】 オオミジンコ *Daphnia magna* を COMBO 培地を段階希釈した貧塩培地で飼育し、その影響を観察した。さらに、飼育実験の結果に基づき、通常濃度の 10% の培地濃度の貧塩環境に 24 時間暴露した際に発現する遺伝子を、Suppressive Subtractive Hybridization 法により網羅的にクローニングした。得られた遺伝子はその塩基配列を解析し、相同性検索により機能予測を行った。

【結果および考察】 オオミジンコ飼育に用いる培地を、純水で希釈することで貧塩培地を作成し、貧塩環境でオオミジンコを飼育した結果、塩分がほぼ含まれない純水では、暴露後 12 時間までにすべての個体が、通常濃度の 3.125% の培地では 20% の個体が 36 時間までに死亡した。6.25% 以上の濃度の環境では、36 時間までに死亡する個体はいなかった。以上の結果から、通常濃度の 6.25% 以上の培地濃度では、全ての個体が塩分低下に適応することができることが明らかとなった。この結果を受けて、通常濃度の 10% の濃度の培地を貧塩環境として、貧塩環境に応答して発現する遺伝子群を Suppressive Subtractive Hybridization 法によってクローニングした。塩基配列が明らかとなった 127 クローンについて、相同性検索と機能予測を行った。その結果、127 クローンのうち、29 クローンはデータベースのいずれの配列にも相同性を認められない未知の配列を持つ遺伝子であった。また、有意な相同性を持つ配列がデータベース上には存在するが、機能が未知であるものが 14 クローンあった。残りの 84 クローンは既知配列と相同性があり、また機能予測が可能であり、主な機能として「イオン結合と輸送」、「(その他の)物質輸送」、「ストレス応答」、「シグナル伝達」、「遺伝子転写関連」、「タンパク質合成」、「エネルギー生成」に大別された。中でも、「イオン結合と輸送」、「物質輸送」は、塩分に直接関連する生理機能であり、貧塩適応に重要な役割を担うと考えられた。特に、カルシウムの貯蔵・輸送に関わる遺伝子が複数同定されたことから、各種成分の中でもカルシウムの減少への適応の重要性が示された。

1. 研究目的

水圏生物にとって種々の塩類の濃度は、重要な環境要因の一つである。ある生物が通常生息する環境の塩分より高い塩分への暴露に対する耐性・適応については、これまで、微生物から水圏動植物のみならず、応用的なニーズから酵母や植物等、種々の生物において、個体レベルから細胞・分子レベルに至る非常に多くの研究例がある⁽¹⁻³⁾。その一方で、低塩分環境に対する生物の耐性や適応機構については、気水域に生息する生物や、河川と海洋を行き来する通し回遊魚の限られた種の研究⁽⁴⁾をのぞいて、その研究数は極端に少ない。

一方、生物の進化と現在の生物の生息環境を塩分の観点からとらえると、高等生物は、その進化の過程において、環境中に豊富な塩類を含有する海洋から、塩類の乏しい淡水域への進出の過程で、塩類を貯蔵・確保する必要が生じ、その機能を進化させてきたと考えられる。脊椎動物の骨組織が、淡水域に侵入した魚類のカルシウム貯蔵にその機能的起源を有することは、その代表的な例の一つである。

このように、淡水性の生物には、貴重な塩類を有効に利用するための種々の機能が備わっていると考えられる。特に、体内の恒常性の維持機能が十分に発達していない無脊椎動物では、体内の塩分組成を環境水のものとは大きく異なる状態では維持できないため、体内に存在する塩分も少ない。従って、塩類の貯蔵や利用に関わる独自の機能を有する可能性がある。しかしながら、淡水性の無脊椎動物では、体液組成や浸透圧に関する分析的な研究例はみられるものの^(5,6)、塩類の利用や貯蔵に関する機能に着目した研究は今までなされてこなかった。

本研究では、貧塩環境への適応に関する知見の乏しい水圏無脊椎動物について、実験動物学的知見の蓄積が豊富な淡水性甲殻類オオミジンコ *Daphnia magna* を用いて、分子生物学的手法により塩類の乏しい環境への適応を通じて獲得した貧塩適応機能を明らかにすることを目的とする。その第一歩として、オオミジンコを貧塩環境に暴露し、それに応答して発現する遺伝子群の単離および機能同定を行った。

2. 材料および方法

2.1 オオミジンコの飼育と貧塩環境暴露実験

本研究では、国立環境科学研究所で経代飼育されていたオオミジンコを1個体から飼育・繁殖させて、遺伝的に均一なクローン集団を実験に用いた。通常の飼育には、水道水を活性炭フィルターによって塩素除去した後、さらにガラスフィルター GF/F(whatman)で濾過し0.7 mm以上の粒子を取り除いた水を使用した。オオミジンコの飼料には単一培養した緑藻 *Chlamydomonas reinhardi* (株番号 IAM C-9)を用いた。遠心分離によって集藻した本藻をおよそ 1×10^5 cells \cdot ml⁻¹の濃度になるように飼育水に添加することにより給餌した。給餌は2日毎に行った。飼育は、恒温培養機内で行い、飼育水温は20°C、明暗周期は明期14時間:暗期10時間に維持された。

貧塩分暴露実験を行う際には、実験に用いる個体の親となる個体を生後直後からCOMBO培地⁽⁷⁾(Table 1に組成を示す)を用いて飼育した。貧塩分暴露による生残実験には、単一の個体から同時に生まれた姉妹個体を親とする個体の集団を実験に用いた。貧塩分環境として、COMBO培地のMajor Elementsのみを段階希釈した飼育水(培地濃度100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%)を用いた。暴露後36時間まで6時間毎に観察を行い、各実験区における遊泳活性の低下した個体および死亡個体を記録した。貧塩分暴露実験中は各実験区につき20個体のオオミジンコを単一の飼育槽(容積約1L)中で維持し、給餌による塩分濃度の変化をさけるため無給餌で飼育した。

2.2 貧塩環境に応答する遺伝子の網羅的同定

本研究では、2群間で発現量の異なる遺伝子を網羅的に同定する手法である Suppressive Subtractive Hybridization (SSH) 法によって、貧塩分暴露によって発現量が変動する遺伝子の同定を行った。貧塩分環境への暴露実験の結果から、貧塩分環境として、通常の10%の塩分の combo 培地を設定し、24時間暴露した。本実験には、1個体の親から同時に生まれた同一クラッチの個体を用いた。それぞれの条件で飼育された個体の成長段階をそろえるために、通常濃度の対照実験区でも同じ時間飼育した。それぞれの実験区で各10個体から QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (GE Healthcare) によって mRNA を抽出した。SSH 法による貧塩分によって発現量が増加す

Table 1. The composition of COMBO medium⁽⁷⁾

Major elements			Algal trace elements		
	mg/l	umol/l		mg/l	umol/l
Ca	10.0	250.0	EDTA	3.4	11.7
Cl	18.5	521.9	Fe	0.21	3.7
Mg	3.9	150.0	Mn	0.05	0.9
SO ₄	14.4	150.1	Cu	0.00025	0.004
K	7.8	200.0	Zn	0.005	0.08
P	1.6	50.0	Co	0.003	0.05
Na	31.0	1,350.3	Mo	0.0086	0.09
N	14.0	1,000.0	Se	0.001	0.012
CO ₃	9.0	150.0	V	0.0005	0.01
Si	2.8	100.0			
B	4.6	426.0			
Animal trace elements			Vitamins		
	mg/l	umol/l		mg/l	umol/l
Li	0.05	7.3	B12	0.00055	0.0004
Rb	0.05	0.6	Biotin	0.0005	0.002
Sr	0.05	0.57	Thiamin	0.1	0.3
Br	0.0125	0.16			
I	0.0025	0.02			

The concentration of all of the elements in the medium was indicated in weight and molar units.

る遺伝子の同定には、PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Promega)を用いた。得られた遺伝子断片は、pGEM-T easy plasmid vector (Prmega)にサブクローニングした後、塩基配列の解析をおこなった(Macrogen Inc. 社への受託解析)。得られた塩基配列は、塩基配列/アミノ酸配列データベースを利用し、相同性検索プログラムである blastx によって相同性の高い翻訳後のアミノ酸配列を持つ遺伝子を検索し、同定遺伝子の機能推定を行った。これらの作業は、解析ソフトウェア BLAST2GO (<http://www.blast2go.de/>)を用いて行った。

3. 結果および考察

3.1 オオミジンコの貧塩環境での生残率

COMBO 培地を段階希釈して作成した貧塩分環境へのオオミジンコの暴露実験の結果を Fig. 1 に示した。通常の50%塩分濃度環境では、オオミジンコには何の影響も観察されなかった。25%以下の貧塩分環境では、暴露後6時間以降に遊泳活性の低下(Swim Inhibition)を示す個

体が観察された。25% ~ 6.25%の塩分濃度の範囲でおよそ30%の個体に遊泳活性の低下が認められたが、観察した暴露時間36時間までに死亡する個体は認められなかった。通常の3.125%の塩分の培地では、20%(4/20個体)の個体が36時間までに死亡し、40%の個体に遊泳活性の低下が認められた。脱イオン水を用い、塩分含量ほぼ0%とした実験区では、暴露後6時間までにすべての個体が死亡した。

淡水域に生息する生物をもちいて、さらに低濃度の塩分環境に暴露する実験はこれまでほとんど行われていない。実際には、淡水域の塩分濃度は極めて安定的であり、より貧塩分の環境に暴露されることが起こりえないのがその理由であろう。しかし、本研究では、貧塩環境への適応時に発現する遺伝子を同定し、その情報をもとに塩類の生理機能や関連する分子機構を解明することが目的であり、そのためには、極めて人工的な環境であっても、貧塩分に暴露した際のオオミジンコの生残率等の観察は必須の実験である。本実験結果より、COMBO 培地での飼育で

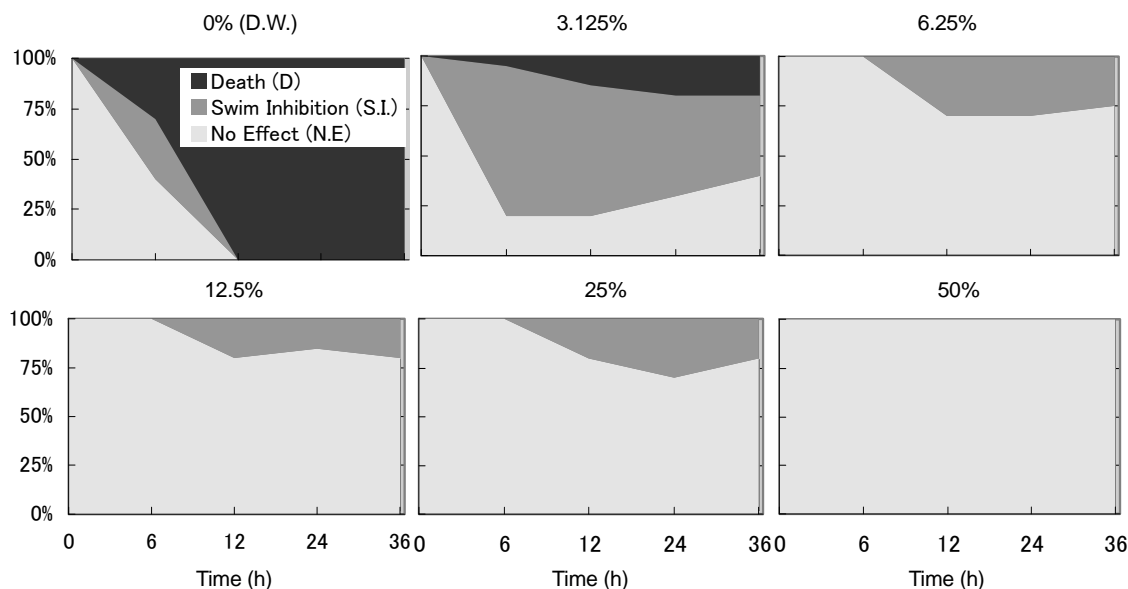


Fig. 1. Effect of the decrease in medium solute content on *Daphnia magna*

は、通常濃度の6.25%の濃度の環境では36時間までに死亡する個体は認められなかった。これ以上の濃度では、塩分の低下に対しオオミジンコは何らかの生理的応答を行い、貧塩環境に適応したと考えられる。なお、方法にも記述した通り、本実験では、貧塩分暴露中は、餌藻類からの塩分の持ち込みの影響をなくするため、無給餌で飼育した。また、予備実験において無給餌での長時間の飼育では、餌不足による影響により通常塩分の培地でも遊泳活性の低下が観察されたため、暴露実験の観察は36時間までとした。

3.2 貧塩環境に応答する遺伝子の同定

上述の実験結果から、貧塩応答遺伝子の同定のための貧塩分暴露条件を、通常塩分濃度の10%、24時間と設定した。SSH法によって得られた貧塩分環境で発現量が増加する遺伝子群のうち、144クローンのcDNA断片の塩基配列を解析した。そのうち、塩基配列が解析できた127クローンについて、それらの塩基配列をデータベースを利用した相同性検索および機能予測に供した。127クローンのうち、29クローンはデータベースのいずれの配列にも相同性を認められない未知の配列を持つ遺伝子であった。また、有意な相同性を持つ配列がデータベース上には存在するが、機能が未知であるものが14クローンあった。残りの84クローンは既知配列と相同性があり、また機能予測が可能であった。

予測された機能は、多様な生理機能に関連するものであったが、中でも「イオン結合と輸送」、「輸送(その他の化合物を基質とした)」、「ストレス応答」、「シグナル伝達」、「遺伝子転写関連」、「タンパク質合成」、「エネルギー生成」に関連した遺伝子が多く認められた。これらの関連遺伝子の例をTable 2に示した。

「イオン結合と輸送」は、本実験で操作した塩分に直接関連する生理機能である。多くの無脊椎動物では体液の溶質組成の維持機構は魚類等の脊椎動物に比べて不完全であり、体内の塩分は環境の塩分変化の強い影響下にあることが知られている⁽⁸⁾。イオン結合と輸送関連遺伝子は、貧塩分環境暴露による体内の溶質組成の変化に応答して、体内の恒常性を維持や必要な溶質の貯蔵を行うために発現したと考えられる。特に、小胞体に存在しカルシウム貯蔵・濃度調節を担う⁽⁹⁾ reticulocalbin や、カルシウムイオンの輸送を担うcalcium-transporting ATPaseなど、カルシウムの貯蔵・輸送に関わる遺伝子が複数同定されている。このことは、各種成分の中でもカルシウム濃度の減少がオオミジンコにとって特に重要な変化であることを示唆している。これまでの研究によって、飼育実験の結果からオオミジンコはカルシウム・マグネシウムを多量に含む硬度の高い水に適応的な種であることが知られており⁽¹⁰⁾、本研究の結果はこのことを分子生物学的に裏付けているといえる。また、これらの分子は、オオミジンコにおけるカルシウム貯

Table 2. Examples of salt-deficient responsive genes categorized by their functions

Functional category	Description	Length (bp)	Max eValue	Similarity mean
Ion binding and transport	Reticulocalbin. (Calumenin)	617	1.00E-61	71.70%
	Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic / endoplasmic reticulum type	382	1.00E-57	86.00%
	ferritin 1-like protein	321	1.00E-49	64.50%
	Calmodulin	648	1.00E-79	99.55%
	sulfate transporter	601	1.00E-34	58.60%
transport	transmembrane 9 superfamily protein member 4	219	1.00E-19	94.80%
	solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine)	412	1.00E-47	74.55%
	ATP-binding cassette transporter	588	1.00E-15	49.40%
	broadly selective sodium/nucleoside transporter	365	1.00E-37	82.75%
	transmembrane 9 superfamily member 2	428	1.00E-11	63.45%
Stress response	heat shock protein	498	1.00E-23	74.40%
	defense protein	445	1.00E-07	57.40%
	putative alpha-2-macroglobulin immunity protein	574	1.00E-42	69.35%
	tyrosine aminotransferase	432	1.00E-55	78.65%
	cytochrom P450	555	1.00E-11	63.45%
Signal transduction	Signal transducing adaptor molecule	561	1.00E-53	69.45%
	map kinase-interacting serine/threonine kinase	697	1.00E-13	74.30%
	cyclin-dependent protein kinase 5	450	1.00E-12	57%
transcription-related	leucine-rich ppr-motif containing protein	731	1.00E-16	71.05%
	splicing factor	526	1.00E-29	69.95%
	DEAD box polypeptide 18	422	1.00E-47	85.25%
protein production	ribosomal protein s8	482	1.00E-61	89.00%
	ribosomal protein 127a	311	1.00E-29	92.15%
	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	434	1.00E-22	72.20%
	ribosomal protein L36e	466	1.00E-19	71.50%
Energy production	lipase 1 precursor	621	1.00E-27	51.30%
	NADH dehydrogenase subunit 1	412	1.00E-39	74.50%
	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	543	1.00E-97	92.65%
	glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase	268	1.00E-29	85.65%
	cytochrome oxidase subunit 3	551	1.00E-77	90.00%

蔵機構解明の手がかりとなる。

各種イオン以外の基質の「輸送」機能に関連する遺伝子も多く同定された。細胞膜を介した物質の輸送には、膜の内外のイオン濃度勾配を駆動力として利用するものがある。従って、本実験で暴露した貧塩分環境中では、体内の溶

質組成が変化することによる輸送の駆動力の変化が生ずることが予想される。また、輸送タンパク質の基質認識にも影響を与える可能性があり、貧塩分暴露により体内の物質輸送が影響を受けていることが推測される。実際、海産二枚貝であるマガキ・ムラサキガイにおいては、体液の塩

分濃度の低下によって、細胞膜を介してアミノ酸の一種であるタウリンを輸送するタウリン輸送体の活性が低下することが知られている^(11,12)。

「ストレス応答」に関連する遺伝子が同定されたことは、本実験での貧塩分暴露がオオミジンコにとって何らかのストレスを与えていることを示している。オオミジンコは、貧塩分ストレスに対して、損傷タンパク質の修復を担う *heat shock protein* や生体防御機構に関連する各種遺伝子など、多様なストレス応答関連遺伝子を発現することで適応していることが明らかとなった。その他、「シグナル伝達」、「転写関連」、「タンパク質合成」、「エネルギー生成」など多岐にわたる生理機能に関連する遺伝子の発現がみられることを考慮すると、貧塩分への暴露は、オオミジンコは様々な生理機能に支障をきたすことを示している。貧塩分環境がそれぞれの生理機能に影響を与える過程の詳細を、発現遺伝子のカタログから推測することは困難であるが、すべてのタンパク質は体液・細胞液中に存在し、その機能や立体構造の維持のためにはそれぞれに適した塩分濃度が必要であることが、このような様々な機能を持つ遺伝子の発現がおこる理由の一つであると考えられる。

本研究では、オオミジンコの貧塩分環境暴露時に発現する遺伝子群の同定を行い、その機能予測を行った。127の遺伝子断片の塩基配列・機能予測の結果、貧塩分適応時には種々の生理機能に関連する遺伝子が発現することが明らかとなった。なかでも、「イオン結合・輸送」や「物質輸送」など、塩分に直接関係する生理機能に関連する遺伝子は貧塩分応答の重要な役割を担うと考えられる。特に、カルシウム貯蔵・輸送関連遺伝子が発現していたことにより、貧塩分適応機構におけるカルシウムの減少への適応の重要性が示された。

4. 今後の課題

本研究で得られた貧塩分応答の遺伝子カタログは、オオミジンコの貧塩分適応の分子機構、塩に関連する生理機能の分子機構解明の第一歩と位置づけられる。今後の課題としては、まず得られた遺伝子の発現解析が挙げられる。また、本研究でえられた塩基配列は、その多くが遺伝子の一部の領域に限られる。予測機能に基づいて重要性の高い遺伝子から、その全塩基配列の解析を行う必要がある。特に、カルシウムの貯蔵・輸送に関わる遺伝子が貧塩分適

応に重要な役割を担うと考えられることから、これらの分子を中心に研究を進めたい。さらに、本研究では、上述した機能予測が可能であった遺伝子以外に、機能未知の遺伝子が43クローン得られた。これらの遺伝子の中にこそ、塩分低下に適応するための未知の重要な役割を担うものが存在する可能性が高い。これらの遺伝子については、塩基配列が未解析である領域の塩基配列解析を進めた後に、再度相同性検索に供することで機能予測を進める必要がある。また現在、オオミジンコの近縁のミジンコでゲノム解析が行われており、ドラフト解析は既に終了し、さらに精度の高い解析による解析が進んでいる (<http://wfileabase.org/>)。解析が進めば、本研究を進めていくうえで貴重な情報源となる。

参考文献

1. S. Varsamos, C. Nebel, G. Charmantier Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. *Comp Biochem Physiol A*. 2005; 141(4):401-29.
2. J. Cuartero, M.C. Bolarín, M.J. Asíns, V. Moreno. Increasing salt tolerance in the tomato. *J Exp Bot*. 2006; 57(5): 1045-58.
3. D. Kültz, D. Fiol, N. Valkova, S. Gomez-Jimenez, S.Y. Chan, J. Lee. Functional genomics and proteomics of the cellular osmotic stress response in 'non-model' organisms. *J Exp Biol*. 2007 May; 210:1593-601.
4. Y. Takei, S. Hirose. The natriuretic peptide system in eels: a key endocrine system for euryhalinity? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002; 282(4): R940-51.
5. Dietz TH, Byrne RA, Lynn JW, Silverman H. Paracellular solute uptake by the freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Am J Physiol*. 1995 Aug; 269: R300-7.
6. Ebanks SC, Grosell M. Fluid and osmolyte recovery in the common pond snail *Lymnaea stagnalis* following full-body withdrawal. *J Exp Biol*. 2008; 211: 327-36.
7. S. S. Kilham, D. A. Kreeger, S. G. Lynn, C. E. Goulden, L. Herrera. COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* 1998; 377: 147-159
8. Potts, W.T.W., Parry, G. Osmotic and ionic regulation in animals. Pergamon Press (Oxford), 1964.

- J. Drever, I. The Geochemistry of Natural Waters: Surface and Groundwater Environments, 3rd ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1997.
9. Ozawa M, Muramatsu T. Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca(2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl-terminal HDEL sequence. *J Biol Chem.* 1993; 268(1):699-705.
10. Alstad N.E.W., Skardal L., O.H. Dag. The effect of calcium concentration on the calcification of *Daphnia magna* *Limnol. Oceanogr.*, 1999; 44(8):2011–2017
11. Hosoi, M., Takeuchi, K., Sawada, H. and Toyohara, H. Expression and functional analysis of mussel taurine transporter, as a key molecule in cellular osmoconforming. *J. Exp. Biol.* 2005;208:4203–4211.
12. Hosoi, M., Shinzato, C., Takagi, M., Hosoi-Tanabe, S., Sawada, H., Terasawa, E. and Toyohara, H. Taurine transporter from the giant Pacific oyster *Crassostrea gigas*: function and expression in response to hyper- and hypo-osmotic stress. *Fish. Sci.* 2007;73; 385–394.

No. 0719

Studies on the Molecular Mechanism of Adaptation to Salt-Deficient Condition in *Daphnia magna* - Cloning of Genes Responsive to Salt-Deficient Condition -

Masatomi Hosoi, Shuhei Ban

School of Environmental Science, University of Shiga Prefecture

Summary

Salinity concentration is one of the important environmental factors for an aquatic life. Although the adaptation or tolerance to hypersalinity has been intensively investigated in various animals, plants or microorganisms, the adaptation to salt-deficient condition has hardly been studied except in some brackish species or diadromous fish. Consequently, it is speculated that freshwater species has developed some unique functions to maintain and to utilize various salt factors in low salinity condition, which are still unexplained. In this study, we tried to understand the molecular mechanism of adaptation to salt-deficient condition by the comprehensive cloning of genes responsive to salt-deficiency in the water flea, *Daphnia magna*. The salt-deficient conditions were prepared by the serial dilution of COMBO medium (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50% of concentration), and the salt-deficient effects on daphnids were observed. According to the observation, then genes responsive to hyposaline condition, that was 10% of salt concentration of COMBO medium, were cloned comprehensively by suppressive subtractive hybridization method. The cloned genes were sequenced and their function were predicted by homology search.

All daphnids in 0% of medium salt (H₂O) dead in 6 hours after the exposure, and 20% dead in 3.125% medium in 36 hours. On the other hand, under the conditions with above 6.25% of medium concentration all daphnids could survive for 36 hours. According to these results, salt-deficient condition was set as 10% concentration of the COMBO medium for cloning suppressive subtractive hybridization experiment. By the functional prediction of sequenced 127 genes, major functional categories were 'ion binding and transport', 'transport', 'stress response', 'signal transduction', 'transcription', 'protein production' and 'energy production'. Above all, 'ion binding and transport' and 'transport' categories directly related to the salt-deficient stress. Genes involved in these categories may play important roles in the adaptation to the salt-deficient condition. Especially, some genes related to calcium ion accumulation and transport were cloned, indicating the importance of the response to the decrease in calcium in the adaptation to salt-deficiency in the daphnid.