

## Short Report

## レイシガイのトランスクリプトーム解析のためのサンプル作製法の確立 レイシガイの卵嚢形成と蝟集に関わる遺伝子を求めて

岡野桂樹<sup>1</sup>, 松井優弥<sup>1</sup>, 保坂芽衣<sup>2</sup>, 中林信康<sup>2</sup>, Wong Yue Him<sup>1</sup>, 小黒-岡野美枝子<sup>1,3</sup>,

<sup>1</sup> 秋田県立大学 生物資源科学部 応用生物科学科

<sup>2</sup> 秋田県水産振興センター, <sup>3</sup> ヤマザキ動物看護大学

レイシガイは肉食性の巻貝である。レイシガイの駆除は秋田県におけるイワガキの資源保護にとって重要である。レイシガイの繁殖の成功は丈夫な卵嚢の集合体（卵塊）を形成し、少ない卵（胚）で効果的に繁殖する繁殖方法によるところが大きい。本研究の目的は、レイシガイのトランスクリプトーム解析を行う手法を確立し、卵嚢形成や卵塊へのレイシガイの蝟集に関する分子情報を集積することである。サンプルには、胚、ベリジャー幼生、成熟雌個体由来のエラ、外套膜、卵巣と雌の卵管肥大部を3つに分割したもの、及び卵塊に蝟集し、まさに産卵直前の雌個体の卵管肥大部と脚傍傍の三角形の小肥大部を用いた。成熟雄の消化管も対照として加えた。これらから高品質のトータル RNA を取得し、ライブラリーを作製し、バイオテクノロジーセンターのイルミナ HiSeq1000 でシーケンスした。予備的なトランスクリプトーム解析の結果、卵嚢形成に関与すると思われる卵管肥大部に特異的に発現し、分泌タンパク質をコードする遺伝子群のうち、発現上位を占める3つの遺伝子はミゾコブシボラの卵嚢タンパク質と高い相同性を示した。したがって、卵管肥大部は卵嚢形成器官であり、巻貝の主要な卵嚢タンパク質は共通の祖先を持つ可能性が明らかとなった。

**キーワード：**レイシガイ, 肉食性巻貝, イワガキ稚貝の被害, トランスクリプトーム, サンプル調製

レイシガイ (*Thais bronni*, または *Reishia bronni*, 図1) は、軟体動物門・腹足綱・吸腔目・アッキガイ科・レイシガイ亜科に属する肉食性の巻貝 (Barco *et al.*, 2010) である。潮間帯から水深 10 m くらいまでの岩礁に生息し、イワガキの稚貝を食い荒らすため、駆除方法の確立が望まれている (加藤, 2014 ; 中林, 2014 ; 松山, 2015 ; 山田, 2011)。レイシガイのひとつの特徴は比較的少数の胚を卵嚢中で扶育することで、効果的に子孫を残せることである (岡野ら, 2015)。また、多くの個体が特定の場所に集まって産卵し、多数の卵嚢からなる大きな卵塊を形成することも生態学的には重要で、この性質のため、子孫をより有効に残せると思われる (図1右)。

本研究の究極の目的は、レイシガイの性質、特に卵嚢の形成する性質や卵塊に蝟集する性質を分子レ

ベルで解析し、レイシガイの駆除や新素材開発の基盤を確立することである。

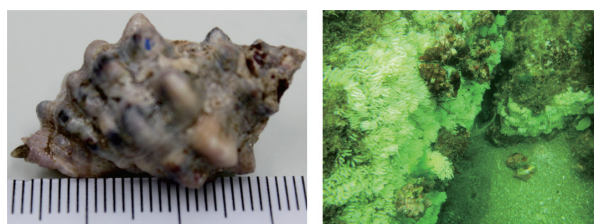


図1 レイシガイ

左: 殻とサイズ。右: 実海面で形成した卵塊と卵塊に蝟集するレイシガイ。

ただし、レイシガイについては、一部の分類に関する情報 (Barco *et al.*, 2010) を除き、分子生物学的な研究は存在しない。もちろん、トランスクリプトーム法が適用されたことはない。

*de novo* トランスクリプトーム法はゲノムが明らかにされていない生物における遺伝子情報を網羅的に得る上できわめて有効な手法である。しかし、トランスクリプトームは RNA の品質、RNA を得る時期、複雑な細胞からなる多細胞生物の場合どのように解剖し、どの細胞から RNA を得るかが鍵を握る（岡野ら, 2017）。

そこで本研究では、トランスクリプトームからレイシガイの卵嚢形成や蛸集に関わる遺伝子群を探索する上で重要な次世代シーケンス用（トランスクリプトーム解析用）のサンプル調製法について、検討した。

## 材料と方法

実験に用いたレイシガイは、にかほ市金浦、にかほ市象潟、および潟上市天王における潜水調査で採取したものを使用した。

トータル RNA の抽出には NucleoSpinRNA kit (Takara Bio) を、次世代ライブラリーの作製にはイルミナ社のキット（後述）を用いた。次世代シーケンスは秋田県立大学バイオテクノロジーセンターの Illumina HiSeq1000 (Illumina) を用いた。データ解析には、Trinity software package (Haas *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2011) と Blast2GO PRO を使用した。

## 結果と考察

### 次世代トランスクリプトーム解析サンプル

レイシガイのトランスクリプトームの概要を明らかにするため、胚・幼生期のサンプルと成体期のサンプルを取得した（表 1, 図 2, 図 3）。胚は産卵後 18 日から 20 日を経過し、卵嚢中で発眼し、全体が黒くなった胚（表 1 のフラクション 1, 岡野ら, 2015 の図 7）とその後卵嚢から孵出したベリジャー幼生（表 1 のフラクション 2 ; 岡野ら, 2015 の図 8）をサンプルとして用いた。胚やベリジャー幼生は 400µm 程度の大きさで解剖できなかつたため、そのままトータル RNA の抽出に用いた。

一方、成体のレイシガイについては大きく分けて 2 群のサンプルを調製した（表 1, 図 2, 図 3）。第

1 のサンプル群（表 1 中段, 図 2）は、その年度に産卵していない個体群を実験室内水槽で、十分な餌（ムラサキイガイ）を与え、24℃の水温で飼育した“成熟未産卵個体”を用いた。成熟未産卵個体は産卵の準備がほぼ整っているはずである。

表 1. サンプルのリスト

卵嚢中の胚、および卵嚢から孵出したベリジャー幼生	サンプル名	参照
1 卵嚢形成 18~20 日の胚（発眼：黒胚）	5_1_Blacklar	下記a)
2 ベリジャー幼生	5_2_Lar	下記b)
成熟未産卵個体由来	サンプル名	参照
3 エラ	6_2_Gill	図3A
4 外套膜	6_2_Mantle	図3B
5 雄の消化腺	6_9_Osu9	
6 雌の卵巣	7_1_Ovary	図3C
7 雌で特異的に肥大化した白色部位の一部A(黒緑の腺を含む)	6_8_Mesu8A	図3D1
8 雌で特異的に肥大化した白色部位の一部B(白っぽい)	7_2_Mesu8B	図3D1
9 雌で特異的に肥大化した白色部位の一部C(少し黄色強い)	7_3_Mesu8C	図3D2
実験室内で卵嚢に蛸集し、まさに産みそうな雌由来	サンプル名	参照
10 卵嚢に蛸集した雌の肥大化した白色部位全体	13_1_Fwhite	図4B
11 卵嚢に蛸集した雌の足近傍の特徴的な三角部位	13_2_Ftri	図5A

a) 岡野ら(2015)の図7を参照  
b) 岡野ら(2015)の図8を参照

RNAlater 中で保管されていた成熟未産卵雌個体から、RNAlater 中でさらに解剖を行い、エラ（表 1 のフラクション 3, 図 2 左上）、外套膜（表 1 のフラクション 4, 図 2 左下）、卵巣上部の黄色部分（卵を含む, 表 1 のフラクション 5, 図 2 右上）、および推定卵嚢形成部位（白く肥大した卵管部位, Mesu8 分画 ; 岡野ら, 2016）を単離した。対照として、雄の消化管（表 1, フラクション 5 ; 雌の卵管の近傍に存在）も採取した。

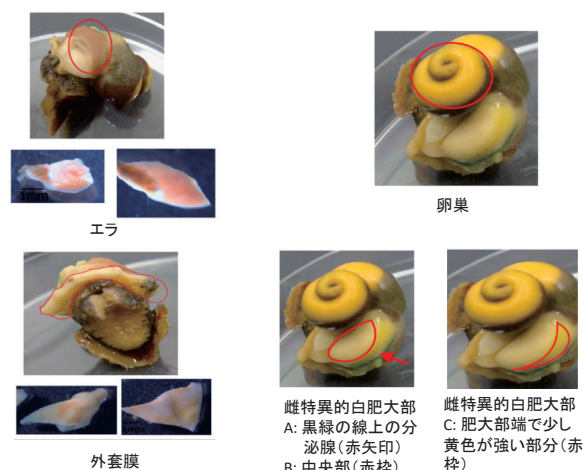
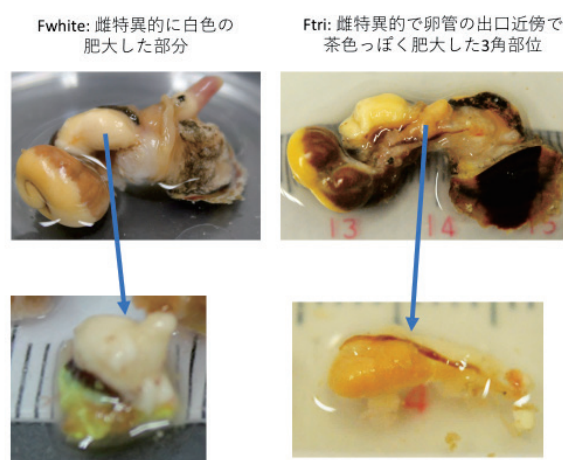


図2 成熟未産卵雌からの解剖（表 1 の中段）  
左上: エラ. 左下: 外套膜. 右上: 卵巣. 右下: 白く肥大した卵管部位の表 1 のフラクション 7, 8, 9 (Mesu\_A, B, C) に対応する部位.

白く肥大した卵管部位 (Mesu8) については、さらに黒緑のライン部分 (Mesu8A, 表 1 のフラクション 7, 図 2 右下の左図赤矢印), 肥大の中央部分 (Mesu8B, 表 1 のフラクション 8, 図 2 右下の左図赤枠), および周辺部で黄色みが少し強い部分 (Mesu8C, 表 1 のフラクション 9, 図 2 右下の右図赤枠) に分けて, RNA を抽出した。

もう一群のサンプルは, 実験室内の水槽で, カキの殻上にできつつある卵塊に群がるように蝟集した個体 (雌) から得た (岡野ら, 2016). これらはまさに産卵直前の個体と考えた. この実験では蝟集雌個体から, 上記の雌特異的に膨大した卵管肥大部 (表 1-10) と卵管の出口付近で特徴的な三角形の小肥大部 (表 1-11) を手早く単離し, 解剖せずに全体を液体窒素中に入れてサンプルとした. 細かい解剖はできないものの高品質の RNA を得やすいためである. 卵管の出口付近の三角形の小肥大部は卵嚢を殻に接着するための接着剤分泌器官 (ventral pedal gland) の可能性があるため, 別に採取した。



単離した雌特異的卵管肥大部 (表1: 10) 単離した足近傍三角部位 (表1: 11)

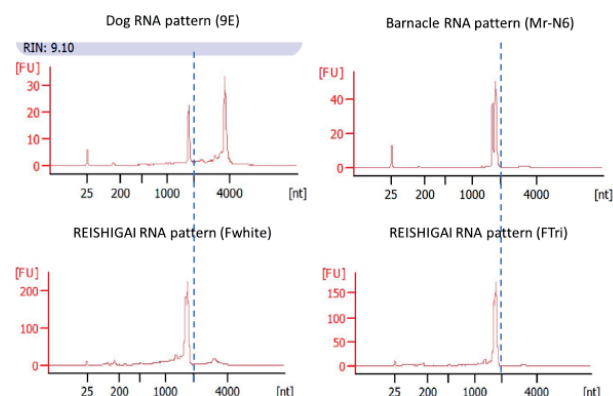
### 図3 卵塊に蝟集中の雌の解剖

左: 卵管白色肥大部 (推定卵嚢形成部位), 表 1 のフラクション 10 のサンプル. 左上: 雌特異的卵管肥大部の位置. 左下: RNA 抽出に用いた部位. 右: 雌特異的表 1 のフラクション 11 のサンプル. 右上: 三角部位の位置. 右下: RNA 抽出に用いたサンプル.

### レイシガイの RNA パターンと品質チェック

Nucleospin RNA kit を用いて, これらのサンプルか

らトータル RNA を抽出後, Agilent 社の Bioanalyzer を使って, レイシガイのトータル RNA の品質を調べた (図 4). キットには Agilent RNA 6000 nano kit を使用した. レイシガイの RNA パターンは, 哺乳類で典型的にみられる 18S rRNA (約 1900 bp) と 28S rRNA (約 3800 bp) がほぼ 1:2 で見られるパターン (コントロールは秋田犬; 図 4 左上) と大きく異なり, 1800~1900 bp 付近に broad singlet (28S rRNA がほぼ等分に切れて 18S 近傍の 2 本のバンド, 合計 3 本のバンドが broad singlet を形成するパターン) を示した (図 4 下段の 2 つ). 無脊椎動物ではよく見られるパターンで, アカフジツボの RNA パターン (図 4 右上) と比較的類似していた. 重要なことは 25 bp から 1000 bp にかけて分解 RNA が見られないことであり, このパターンから取得した RNA は品質が高く, 次世代解析が可能であることが明らかとなった。



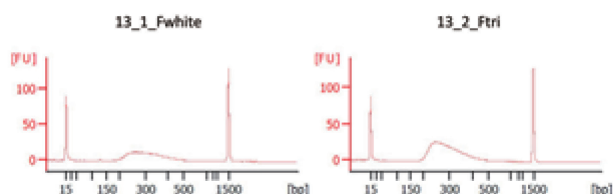
### 図4 レイシガイのトータル RNA パターン

Agilent RNA 6000 nano kit を用いたレイシガイの RNA パターンの比較. 左上: コントロールとして用いた哺乳類 (秋田犬) のパターン. 18S と 28S がほぼ 1:2 で観察される. 右上: フジツボの RNA パターン. 左下と右下: レイシガイの RNA パターン.

### 次世代トランスクリプトームライブラリーの作製

表 1 のフラクション 1~9 のサンプルについては, イルミナ社の TruSeq RNA library Prep kit v2 を用い, また表 1 のフラクション 10~11 のサンプルについては, TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit を用いて, イルミナ社のプロトコルを一部改良して, ライブラリーを作製した. 図 5 にライブラリーの品質チェッ

クを, Agilent 社の Bioanalyzer (Agilent DNA 1000 kit) で行った結果を示した. 左は表 1 のフラクション 10 のサンプルに由来するライブラリーの結果, 右は表 1 のフラクション 11 に由来するライブラリーの結果を示している. 両者とも, タグ部分の 126 bp を除くとインサートサイズは 70 bp ~370 bp 程度で, 大部分のインサートは 130 ~200 bp と見積ることができた.



**図 5 作製されたライブラリーの性質 Bioanalyzer (Agilent DNA 1000 kit)によるライブラリーのサイズ検定の結果.**

左: 表 1-10 由来のライブラリー. 右: 表 1-11 由来のライブラリー.

### シーケンスデータの取得と予備的なトランスクリプトーム解析の結果

3 回にわたって, バイオテクノロジーセンターのイルミナ HiSeq1000 シーケンサーを用いて, 次世代シーケンスデータを取得し, Trinity software package を用いてアセンブルと一部の予備的な解析を行った. また Blast2GO-pro を用いた blast 検索と gene ontology 解析も行った. トランスクリプトームの概要を表 2 に示す.

**表 2. トランスクリプトームの概要**

Total no. of sequences	258083
Total length	162906131 bp
Average length	631 bp
Shortest sequence	224 bp
Longest sequence	29932 bp

cd-hit (95 %) で non-redundant 化し, 約 26 万弱の配列を得ることができた. これらの詳細な解析結果については別稿に譲るが, 本稿で表 3 に示す点については少し記載しておきたい. 表 3 はメスのレイシガイの卵嚢形成に関わると推測された部位 (雌特異的卵管肥大部, 表 1 のフラクション 8, 9, および 10)

に特異的に発現する遺伝子のうち, 分泌タンパク質をコードする遺伝子を選抜し, 表 1 のフラクション 10 のサンプルでの発現量が上位 3 番目に入る遺伝子の blast 検索の結果である. これらはすべてミゾコブシボラ (*Busycotypus canaliculatus*) の卵嚢の構造タンパク質 (egg capsule proteins, Wasco *et al.*, 2014) と高い相同性を示した.

**表 3. トップ 3 遺伝子のブラスト検索の結果**

	cDNA length	Mat. peptide length	Blast Top Hit Description	Top hit taxonomy	Blast Top Hit E-Value	Fwhite FPKM
1	2156	495	gij281323263 gb ADA60233.1 capsule protein 1a	<i>Busycotypus canaliculatus</i>	1.1E-50	273491
2	2411	451	gij281323267 gb ADA60235.1 capsule protein 2	<i>Busycotypus canaliculatus</i>	1.5E-55	154705
3	2158	488	gij281323263 gb ADA60233.1 capsule protein 1a	<i>Busycotypus canaliculatus</i>	9.5E-51	68247

ミゾコブシボラはミゾコブシボラ科, またはエゾバイ科に属する大型の巻貝で, アカニシなどでも見られるアコーディオンのような伸縮性のある特徴的な卵嚢を形成する. この卵嚢タンパク質はすでに抽出, クローニングされており, 物性的に特異な性質を示すタンパク質の性状が明らかになり, 注目を集めているものである (Rapoport & Shadwick, 2007 ; Wasco *et al.*, 2014).

レイシガイの卵嚢はミゾコブシボラの卵嚢と形態的にも物性的にも大きく異なるものの, top3 の遺伝子がコードするタンパク質群の E 値が -50 ~ -55 であり, きわめて高い相同性を示すことは, 巻貝の卵嚢成分が共通の祖先から進化してきたことを示しており, とても興味深い. 逆に言えば, 我々が 2016 年に推測していたように成熟したレイシガイの雌で特異的に発達した卵管肥大部 (包卵腺, nidamental gland) (岡野ら, 2016) は, 推測通り卵嚢形成器官 (egg capsule gland) であったことを示す証拠となる.

### 結論と将来展望

本研究により, レイシガイの各部位から RNA を抽出し, 次世代トランスクリプトーム解析を行うことは可能であり, レイシガイの卵嚢形成に関する分子的な理解を進める上で, かなり有効であることが判明した. レイシガイの卵管肥大部に大量に発現するミゾコブシボラの卵嚢タンパク質ホログラムが本当にレイシガイの卵嚢形成に関与するかについては,

今後、これらの遺伝子がコードするタンパク質が、本当に卵囊中に存在するか否かを明らかにしていく必要がある。また、この部位に発現する他の遺伝子群を解析することで、レイシガイの卵囊に関する分子情報が飛躍的に増大すると考えられる。

### 謝辞

本研究は、JSPS 科研費 16K14988 と秋田県立大学平成 29 年度産学連携・共同研究推進事業（秋田県立大、秋田県水産振興センター）の支援を受けて行われた。

### 文献

- Barco, A., Claremont, M., Reid, D.G., Houart, R., Bouchet, P., William, S.T., Cruaud, C., Couloux, A. & Oliverio, M. (2010). A molecular phylogenetic framework for the Muricidae, a diverse family of carnivorous gastropods, *Mol. Phylo. Evol.*, 56: 1025-1039.
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M. & MacManes, M.D. (2013). *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nature Protocols*, 8: 1494-1512.
- Li, B. & Dewey, N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12: 323 [doi: 10.1186/1471-2105-12-323].
- Rapoport, H.S. & Shadwick, R.E. (2007). Reversible labile, sclerotization-induced elastic properties in a keratin analog from marine snails: whelk egg capsule biopolymer (WECB), *J. Exp. Biol.*, 210: 12-26.
- Wasko, S.S., Tay, G.Z., Schwaighofer, A., Nowak, C. and Waite, J.H. (2014). Structural proteins from Whelk Egg Capsule with long range, *Macromolecules*, 15: 30-42.
- 岡野桂樹, 大石哲也, 松山大志郎, 中林信康, 保坂芽衣, 尾崎紀昭, 小黒-岡野美枝子, 山田潤一 (2015). 「レイシガイの摂餌行動, 蝸集, 卵囊に関する基礎研究: レイシガイ駆除技術の開発に向けて」 『秋田県立大

学ウェブジャーナル B』 2: 164-170.

岡野桂樹, 松井優弥, 松山大志郎, 中林信康, 山田潤一, Wong Yue Him, 小黒-岡野美枝子 (2016). 「レイシガイにおける実験室内水槽を用いた卵囊形成系の確立: レイシガイ駆除技術の開発に向けて (2)」 『秋田県立大学ウェブジャーナル B』 3: 179-184.

岡野桂樹, Wong Yue Him, 村口元, 原光二郎, 小黒-岡野美枝子 (2017). 「トランスクリプトームデータから新規の機能性分泌タンパク質群を探索する-フジツボを例として-」 『秋田県立大学ウェブジャーナル B』 4: 80-85.

加藤芽衣 (2014). 「水産資源戦略的増殖推進事業 (イワガキ漁場再生パイロット事業)」 『平成 25 年度秋田県水産振興センター業務報告書』 374-378.

中林信康 (2014). 「イワガキ増産への新たな取り組み」 『平成 26 年度日本水産学会東北支部大会 講演要旨集』 6-7.

松山大志郎 (2015). 「藻場と磯根資源の維持・増大及び活用に関する技術開発 (レイシガイ駆除技術開発)」 『平成 26 年度秋田県水産振興センター事業報告書』 289-290.

山田潤一 (2011). 「イワガキの資源添加技術の開発」 『平成 21 年度秋田県水産振興センター事業報告書』 188-191.

〔平成 30 年 6 月 30 日受付〕  
〔平成 30 年 7 月 10 日受理〕

## Preparation of samples from the carnivorous sea snail, *Thais bronni* (Reishigai) for transcriptomic analysis to study the formation of egg capsule

Keiju Okano<sup>1</sup>, Yuya Matui<sup>1</sup>, Mei Hosaka<sup>2</sup>, Nobuyasu Nakabayashi<sup>2</sup>,  
Wong Yue Him<sup>1</sup>, Mieko Oguro-Okano<sup>1,3</sup>,

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University,

<sup>2</sup> Akita Prefectural Institute of Fishery, <sup>3</sup> Yamazaki University of Animal Health Technology

Reishigai (*Thais bronni*) is a species of carnivorous sea snail belonging to the marine gastropod mollusk in the family Muricidae. There is an urgency in the development of methods to reduce the Reishigai population around the settlement sites of Rock oysters because of the serious predation of juvenile Iwagaki (rock oysters) in Akita Prefecture. In summer, in its natural environment, the Reishigai produces an egg mass complex composed of thousands of cylindrical egg capsules. Conspecific adults tend to swarm around the egg mass. The authors of this paper are interested in the manner in which the egg capsules are formed and in the causes of the swarming of conspecifics around the egg mass because these two features are distinctive to the reproductive strategies of the Reishigai. De novo transcriptome is the most straight forward way to obtain molecular information on the formation of the egg capsule and the swarming activity, but the transcriptome depends on the quality of the RNA, the timing of the sampling, and proper dissection. The sample preparation, unique total RNA pattern, next-generation sequencing, and the preliminary results of the Reishigai transcriptome are described in this paper. As targeted samples, the researchers dissected potential egg capsule glands from mature females and the mature females swarming onto the freshly prepared egg mass. As control samples, dissected gill, mantle, ovary, and potential ventral pedal glands were prepared together with the male digestive organ, embryos, and the veliger larvae. The total RNA patterns obtained via the Agilent bioanalyzer (RNA 6000 nano kit) are unique and show a broad singlet around 18S rRNA and without 28S rRNA. cDNA library was prepared using Illumina kits and was sequenced by Illumina HiSeq1000 at the Biotechnology Center of Akita Prefectural University. The preliminary analysis indicated that potential egg capsule glands highly expressed the homologs of *Busycotypus canaliculatus* egg capsule proteins.

**Keywords:** carnivorous sea snail, *Thais bronni*, Reishigai, transcriptome, egg capsule