

令和元年6月16日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14988

研究課題名(和文)トランスクリプトームとプロテオームを用いたレイシガイの卵囊の解析とその応用

研究課題名(英文)Molecular understanding of the egg capsule formation in the REISHIGAI, *Thais bronni*

研究代表者

岡野 桂樹 (Okano, Keiju)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：40147070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：レイシガイのトランスクリプトーム解析を行い、卵囊形成期の卵囊形成器官に特異的かつ高発現する遺伝子を探索した。その結果、大型の巻貝ミゾコブシボラのegg capsule proteinの複数のホモログとアミン酸化酵素を見いだした。これらについて、抗ペプチド抗体を作製し、卵囊のパラフィン切片を用いて、免疫染色を行った。その結果、これらが卵囊に存在することが明らかとなった。これらの結果は、これらの遺伝子産物が卵囊形成器官でつくられ、卵囊中に蓄積されることを意味しており、これらがいわゆるレイシガイの卵囊タンパク質、または卵囊形成に関与するタンパク質であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではトランスクリプトーム解析と免疫染色の結果から、レイシガイの卵囊の主要成分(複数存在)がミゾコブシボラの卵囊タンパク質のホモログであること、およびアミン酸化酵素が卵囊の硬化に関連する可能性を明らかにした。また、ニチリンヒトデの忌避タンパク質のホモログも蛸集期の卵囊形成器官だけに特異的かつ大量に発現しており、この分子が、何らかの生物間相互作用に関わる可能性が見いだされた。レイシガイは、構造的に優れた卵囊中で比較的少数の胚を育てその周辺に蛸集することが生殖の特徴である。本研究が、巻貝の卵囊の基礎的な研究に留まらず、イワガキ稚貝への食害をもたらすレイシガイの駆除法の開発につながることを望む。

研究成果の概要(英文)：Reishigai (*Thais bronni*) is a species of carnivorous sea snail belonging to marine gastropod mollusk in the family Muricidae. Its predation on the juvenile rock oysters is very serious in Akita. Egg capsule formation and the swarming of conspecifics around the egg mass are characteristic of the successful reproduction of REISHIGAI. To understand how the egg capsule are formed and what causes the swarming of conspecifics around the egg mass, the REISHIGAI transcriptome composed of larvae, adult body parts including fully matured egg capsule glands was constructed and analyzed.

DEG analysis indicated that the top two highly expressed egg capsule-specific transcripts encoded the homologs of *Busycotypus canaliculatus* egg capsule proteins. Immunohistochemical staining using anti-peptide antibodies against two Tb-homologs provided the evidence for the presence of these proteins in the egg capsules of *Thais bronni*, indicating that these proteins are the structural components of egg capsules.

研究分野：海洋分子細胞生物学

キーワード：レイシガイ イワガキ稚貝への食害 卵囊 卵塊 肉食性巻貝 egg capsule protein amine oxidase

1. 研究開始当初の背景

(1) レイシガイは軟体動物門・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小型巻貝である¹。近縁種のイボニシについては特に環境ホルモン関連で多数の論文があるものの、レイシガイについては、分類に関する論文とイワガキなどへの食害に関する論文がわずかにあるのみで、その生態や生理的な情報はほぼ皆無である。

(2) 秋田県では、レイシガイは夏の代表的な味覚であるイワガキの稚貝を食害するため、駆除の対象となっている²。一方、レイシガイは独特の苦味があり美味で、酒の肴として珍重されている。我々は2015年度から、秋田県水産振興センターと共同で、レイシガイの駆除を目的に、フィールドと実験水槽内のレイシガイの行動に関して、基礎的なデータの集積を図った³。その過程で、レイシガイの個々の個体は一回に約5000個程度の卵しか産卵せず、少ない胚を卵囊中で効果的に扶育することで、効果的に子孫を残すこと、フィールドで初夏にレイシガイが大きな卵塊を形成し、蝸集する傾向があることを知り、卵塊がレイシガイの生殖の鍵を握る構造であること、卵塊の破壊と卵塊への蝸集を利用した駆除法が有効であることに気づいた。さらに卵塊を構成する卵囊がきわめて合理的で美しい構造を持つことに感銘を受け、その構造を解明し、水中で機能するおもしろい素材の開発を行えると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、レイシガイがつくる見事な“海洋機能性構造体”である卵囊の構造・形成に関与する分子を明らかにし、生物を真似た新素材開発の糸口とレイシガイの防除法の開発に関する新たな構想を見出すことである。

3. 研究の方法

(1) レイシガイの入手：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秋田県水産振興センターの潜水調査で採取したものを使用した。レイシガイは、秋田県水産振興センターのオープン水槽、または秋田県立大学の室内100L水槽で飼育し、解剖には、卵塊を作りつつある個体を使用した。

(2) トランスクリプトームの取得とその解析

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 TruSeq RNA library Prep kit v2 または TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit 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^{4,5}、Bowtie、EdgeR、Blast2GO pro などを使用した。

(3) 免疫染色

抗ペプチド抗体の作製はシグマアルドリッチジャパン社に依頼した。レイシガイの卵囊を70% ethanol または、4% paraformaldehyde (PFA) で固定後、パラフィン切片を作製し、脱パラ後ブロッキング、室温で30分間一次抗体処理を行った後、ImmPRESS-AP-REAGENT anti rabbit IgG

と ImmPACT-Vector-Red-AP 発色液を用いて染色した。マウントには VectaMountAQ を用いた。

4. 研究の成果

秋田におけるレイシガイ (図 1A) の産卵期は夏で、岩礁のオーバーハングなどに卵塊 (図 1B) を形成する。卵塊は約 5 mm の高さの円筒型の卵囊 (図 1C) が 30 個程度 (32 ± 15 , $N=16$) ずつ塊を形成し、その塊が多数集まり大集団となったものである。実海域では通常、卵塊の周辺に顕著なレイシガイの蛸集が見られる。このことから、レイシガイの生殖戦略は比較的少数の卵 (胚) を卵囊内でロスなく育てることで達成することであり、卵囊の機能性 (物質的な特性と蛸集要因) がレイシガイの生物学と駆除に重要なことが判明した。

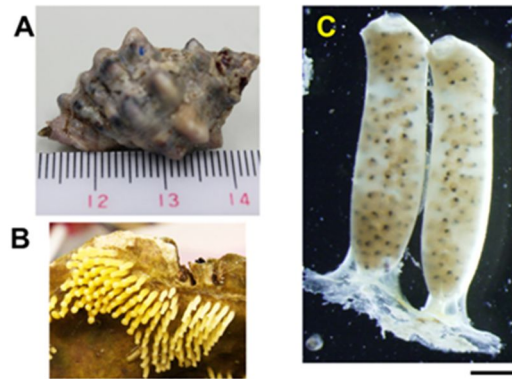


図 1. レイシガイとレイシガイの卵囊. A. レイシガイ、B. イワガキの殻に生みつけられた卵塊. C. 卵囊と内部の胚

(1) 卵囊の形成に関わる器官 (egg capsule gland、卵囊形成器官を称する) の単離法の確立

レイシガイの卵囊形成に関わる遺伝子を探索するためのトランスクリプトームを行う場合、卵囊形成器官を同定することは何より重要である。そこで文献⁶をもとに、産卵期に雌特異的に増大する卵囊形成器官 (図 2) をレイシガイで同定し、その部位を迅速に解剖する手法を確立した。

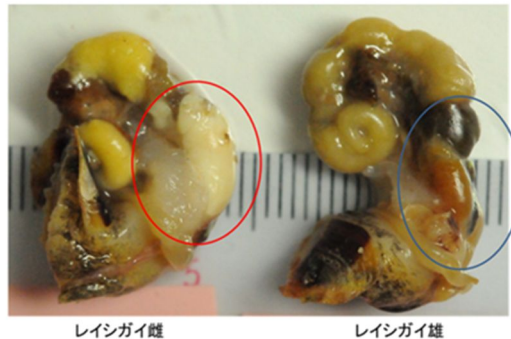


図 2. 産卵期の雌と雄. 左: 雌、右: 雄
産卵期のレイシガイの雌の卵管部位 (赤丸) は大きく白色に肥大している。雄には存在しない。この部位が egg capsule gland である。

(2) 実験室内での産卵と卵塊の形成、卵塊に蛸集する雌個体の解剖

卵囊形成のように遺伝子発現時期が局限される可能性のあるトランスクリプトーム解析を行う上でもうひとつ大切なことは、卵囊形成に関わる遺伝子が発現する時期を特定することである。産卵シーズンの雌個体は明らかに卵囊形成器官が肥大しているが、それとともにまさに産卵しつつある雌個体を得たいと考えた。そこで、そのシーズンに未産卵の個体を集め、実験室内の 100L 水槽で、十分な餌と産卵基盤 (イワガキの殻) を入れて飼育させたところ、イワガキの殻上に産卵が起こることを見出した⁷。また、一旦、卵塊が形成されると、そこに他のレイシガイが蛸集し、次々に産卵が起こることをみいだした。そこで、卵塊に蛸集中の雌個体から卵囊形成

器官 (white part)を単離し、次のトランスクリプトーム解析に供した。

(3) レイシガイのトランスクリプトームの構築

レイシガイのトランスクリプトーム解析には、以下のサンプルから抽出したトータル RNA を用いた。まず、(2)の実験室内で卵塊に蝟集中の雌個体から、卵嚢形成器官 (卵管周辺の白色肥大部、white part)と ventral pedal gland (雌だけに見られ、卵管の出口近傍の三角形部位 (Tri part)) を採取した。また、蝟集はしていないが、産卵期で卵嚢形成器官が十分肥大・発達している雌個体から、2分画の卵嚢形成器官 (完全に白色部位とわずかに黄色がかった部位をわけて)を得た。一方、対照として、産卵期の雌の卵嚢形成器官近傍で黒緑色をした hypobranchial gland (鰓下腺、卵嚢に傷がつくと、内部が急速に紫色になることから、この分泌物も卵嚢内に入ると想定)、卵巣、外套膜とエラを採取した。さらに、卵嚢中の発眼胚、孵化直後の幼生、および雄の消化管 (雌の卵嚢形成器官があるべき位置の近傍、図2の青丸)も対照に加えた⁸。以上11サンプルを用いて、レイシガイの統合トランスクリプトームを作製した。Trinityを用いて、*de novo* assemblyし、その後 cd-hit (95%)でクラスタリングし、合計で 258083 配列を取得した。Average length は 631bp で、longest sequence は 29932 bp であった。

(4) 卵嚢形成器官に特異的に発現する遺伝子群

レイシガイの卵嚢形成に関わる遺伝子は、産卵期の雌の卵嚢形成器官だけに高発現すると仮定し、以下の操作を行った。まず、産卵期の卵嚢形成器官由来の3サンプルから、それぞれ上位10%の高発現遺伝子を選抜し、8832 遺伝子を得た。ついで、EdgeRを用いて、発現量が他の対照部位に比べ、4 fold (16倍)高い遺伝子群を選抜し、488の DE 遺伝子を得た。ついで、488 遺伝子から演繹的に求めたタンパク質配列において、N末端側に分泌シグナル (signal peptide 配列)を持つ遺伝子を探索し、53 配列を得た (egg capsule gland-specific highly-expressed secretory proteins, ecg-she-sp と略す)。以下に特に興味深い遺伝子の詳細を記す。

ミゾコブシボラの egg capsule protein のホモログ

ecg-she-sp 53 配列のうち、蝟集中の雌卵巣で、発現量上位の3遺伝子をみたところ、そ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として同定されている ecp-1, ecp-2 のホモログであった⁹。E値はすべて-50を超えており、総アミノ酸数も比較的似通っていた。発現量は圧倒的で、fpm 値はすべて5桁以上でトップは6桁であった。蝟集中の卵嚢形成器官でも、産卵期の卵嚢形成器官でも、house-keeping genes を含め、すべての遺伝子の発現量トップがこれらの egg capsule protein のホモログであった。この事実は、卵嚢形成器官がこれらのタンパク質を生産するために特化した器官であることを示す。このうち、2種類について、抗ペプチド抗体を作製し、卵嚢中にタンパク質が存在するかどうかを、免疫染色を用いて調べたところ、両者とも染色された。このことから、レイシガイの卵嚢を構成する主成分はミゾコブシボラの卵嚢を構成する主要構成タンパク質のホモログであることが確定した。興味深いことに2種の抗体で染色される部位は大きく異なっていた。したがって、ホモログ間で、

機能的な違いがあると思われる。

アミノ酸化酵素のホモログ

レイシガイの卵嚢は、さまざまな予備的な実験から考えて、何らかの形で架橋されていると推測できた。そこで、酵素をコードする遺伝子を探索したところ、アミノ酸化酵素のホモログが見いだされた。この遺伝子は、蝟集中の卵巢で、発現量が10番目に高い (fpkm=4414) 遺伝子であり、また、同じ卵嚢形成器官同士で比較したところ、蝟集していた卵嚢形成器官の発現量は、蝟集していない産卵期の卵嚢形成器官に比べ、10倍以上増加していた。レイシガイとミゾコブシボラの egg capsule protein 群で共通する特徴は、塩基性アミノ酸であるリジンが大量に含まれる (10%以上) ことである。したがって、この遺伝子産物がリジンの末端アミノ基を酸化することで、タンパク質同士の酸化的な架橋に関わる可能性が明らかとなった。ついで、抗ペプチド抗体を作製し、免疫染色で、卵嚢中にこの遺伝子産物が存在するか否かを調べたところ、存在することが明らかになった。現時点で、アミノ酸化酵素が機能的に本当に egg capsule protein 群の架橋に関わるか否かは不明であるが、少なくとも卵嚢形成器官で発現し、卵嚢中に移行することは証明できた。

ニチリンヒトデの忌避タンパク質のホモログ

卵塊に蝟集中のレイシガイの雌の卵嚢形成器官にだけ、非常に大量に発現し、蝟集していないレイシガイの卵嚢形成器官や他の組織では全く発現しない総アミノ酸数 278 (シグナルペプチドを除く mature protein では 259 aa) の分泌タンパク質をコードする遺伝子が見いだされた。これはニチリンヒトデが分泌し、イトマキヒトデに忌避行動を起こさせるタンパク質 (Nagai & Namikoshi, BAL43194, 総アミノ酸数: 276 aa, mature protein: 256 aa) と高い相同性 (E 値は -55) がある。このタンパク質も免疫染色の結果、卵嚢中に存在することが証明できた。現時点で、その機能は全く不明であるが、形成初期の卵嚢中で他のレイシガイの誘引や、他の生物の忌避などの生物間相互作用に関わる物質であることは否定できない。今後の詳細な解析が必要である。

< 引用文献 >

Barco, A. *et al.*, (2010) *Mol. Phylo. Evol.*, 56: 1025-1039.

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.

岡野桂樹ら, (2015) *秋田県立大学ウェブジャーナル B*, 2:164-170.

Haas B.J., *et al.*, (2013) *Nature Protocols*, 8: 1494-1512.

Li, B. & Dewey, N. (2011) *BMC Bioinformatics*, 12:323

Rapoport, H.S. & Shadwick, R.E. (2007) *J. Exp. Biol.*, 210:12-26.

岡野桂樹ら, (2016) *秋田県立大学ウェブジャーナル B*, 3: 179-184.

岡野桂樹ら, (2018) *秋田県立大学ウェブジャーナル B*, 5, 120-125.

Wasko, S.S. *et al.*, (2014) *Macromolecules*, 15: 30-42.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

岡野桂樹, 松井優弥, 保坂芽衣, 中林信康, Wong Yue Him, 小黒-岡野美枝子 (2018) 「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」『秋田県立大学ウェブジャーナル B』 5: 120-125. 査読なし

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」『秋田県立大学ウェブジャーナル B』 4: 80-85. 査読なし

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嚢形成系の確立: 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. 査読なし

[学会発表]

松井優弥・Wong Yue Him・中林信康・保坂芽衣・尾崎紀昭・小黒-岡野美枝子・岡野桂樹: レイシガイの卵嚢形成に關与するタンパク質群の網羅的探索, 第 31 回海洋生物活性談話会(秋田) 2017.5.20

松井 優弥, Wong Yue Him, 中林 信康, 保坂 芽衣, 小黒- 岡野 美枝子, 岡野 桂樹 (2017) 「レイシガイの卵嚢形成に關与するタンパク質群の網羅的探索」, 第 19 回マリンバイオテクノロジー学会(仙台) PC-2, 2017.6.4

松井優弥, 松山大志郎, 中林信康, Wong Yue Him, 尾崎紀昭, 小黒-岡野美枝子, 岡野桂樹 「レイシガイの卵嚢の構造と卵嚢形成機構に關する研究」 PC-1, 第 18 回マリンバイオテクノロジー学会大会、2016 年 5 月 28 日 ~ 29 日、会場: 北海道大学函館キャンパス(北海道函館市)

6. 研究組織

(1) 研究分担者: Wong Yue Him (2016 年 ~ 2017 年)

所属研究機関名・部局名・職名: 秋田県立大学・生物資源科学部・特任助教

研究者番号: 80769547

(2) 連携研究者: 小黒 美枝子

所属研究機関名・部局名・職名: ヤマザキ動物看護大学・動物看護学部・教授

研究者番号: 20160830

(3) 連携研究者: 尾崎 紀昭

所属研究機関名・部局名・職名: 秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号: 50468120