

Short Report

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)

岡野桂樹¹, 松井優弥¹, 松山大志郎², 中林信康², 山田潤一², Wong Yue Him¹,
 小黒-岡野美枝子^{1,3},

¹ 秋田県立大学 生物資源科学部 応用生物科学科

² 秋田県水産振興センター, ³ ヤマザキ学園大学

レイシガイは小型の肉食性巻貝であり、その食害は秋田県の夏の代表的な味覚であるイワガキの資源保護の重大な障害である。本研究では、第一に実験水槽内でレイシガイの産卵・卵嚢形成が可能か否かについて、第二に卵嚢形成に関与する器官 (egg capsule gland) を同定し、迅速に単離できるかどうかについて検討した。第一の点では、未産卵レイシガイを用い、十分な餌と産卵のための基盤であるイワガキの殻を入れ、産卵期の水温を模倣することで、100 L 実験水槽内での産卵・卵嚢形成に成功した。条件さえ整えば、まったく産卵シーズンではない 1 月でも産卵が観察できた。ひとつの個体が産卵・卵嚢形成すると、そこに他の個体が蝟集し産卵が続き、卵塊を形成する現象が見られた。実験水槽内で卵塊に蝟集した個体の雌雄比は雌 13 個体、雄 19 個体で、自然海域で卵塊に蝟集した個体では雌 21 個体、雄 23 個体であり、卵塊への蝟集には雌雄差がなかった。万力で少しずつレイシガイの固い殻を壊し、貝柱、エラ、外套膜などをメスや解剖バサミで切除していくことで、レイシガイの egg capsule gland を単離する手法を確立した。卵塊に蝟集している雌と雄を比べると、雌でのみ大きく発達した egg capsule gland が観察できた。

キーワード: レイシガイ, 肉食性巻貝, イワガキ稚貝の食害, レイシガイの駆除, 卵塊, 蝟集

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 (<http://www.godac.jamstec.go.jp/bismal/j/view/9035697>; Barco *et al.*, 2010) で、潮間帯から水深 10m くらいまでの岩礁に生息する。秋田県では夏の代表的な味覚であるイワガキの稚貝に対する食害が大きな問題となっている (加藤, 2014; 中林, 2014)。昨年度、我々は摂餌後に満腹となったレイシガイがケミカルシグナルを放出して他のレイシガイの誘引・蝟集を促すこと、レイシガイ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すこと、卵嚢中での胚発生は 20 日以上続くことを見出した (岡野ら, 2015)。これらの事実から、餌となるムラサキガイなどをイワガキ稚貝周辺におき、イワガキ稚貝の食害を防ぐ方法

や卵塊形成初期の卵嚢を物理的に壊す方法などを考案してきた (中林, 2014; 松山, 2015; 岡野ら, 2015)。

本研究では特に産卵と卵嚢形成過程に注目し、実験水槽内での産卵・卵嚢形成条件の検討と卵嚢形成器官の解剖法の開発について研究した。

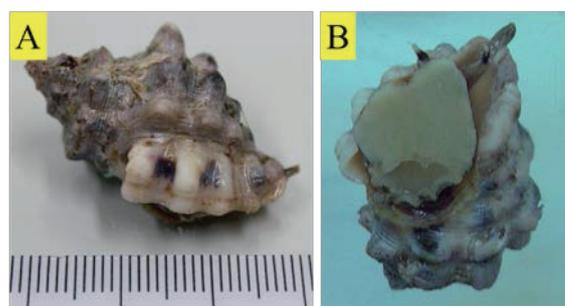


図 1 レイシガイ

A: 殻とサイズ. B: 実験水槽の壁面を移動中のレイシガイを裏面から撮影した写真.

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。レイシガイの餌には、イワガキ稚貝が貴重なため、ムラサキイガイを用いた(岡野ら, 2015)。

レイシガイの産卵実験には 100 L 水槽(上面ろ過)を用いた。その行動の追跡には市販のデジタルムービーカメラ(JVC ビデオカメラ GZ-G5 または Panasonic HC-W850M)を用いた。静止画像はムービーカメラの静止モードか、Nikon D300 カメラを用いて行った。

結果と考察

実験水槽内での産卵・卵嚢形成

レイシガイの産卵期は夏で、6 月ころから行動の活発化が見られる。産卵期になると、レイシガイは岩礁のオーバーハングなどに卵塊を形成する(山田, 2011)。卵塊は約 5mm の高さを持つ円筒型の卵嚢が数ずつ塊を形成し、その塊が多数さらに集まった構造を持つ(岡野ら, 2015)。実海域では通常卵塊の周辺に顕著なレイシガイの蝟集が見られることから卵嚢、または産卵しつつある個体がレイシガイを誘引することで卵塊を形成すると考えられる(山田, 2011; 保坂 私信)。しかし、それを証明する実験は存在しない。この証明には、産卵・卵嚢の形成を実験水槽内で再現することが必須である。

これまで、過去 2 年間さまざまな条件で秋田県立大学の実験水槽内での産卵を試みてきたが、産卵は観察できなかった。これまでの結果を総合すると一度自然界で産卵した個体はどのような条件を用いても同一年では産卵させることは難しいと思われた。

そこで実験 1 として、2015 年 6 月 9 日にレイシガイ 100 個体(未産卵の可能性が高い)を秋田県立大学の実験水槽(100 L)に移し、餌のムラサキイガイを十分に与え、週ごとの捕食量を記録しながら、産卵・卵嚢形成がおこるかどうかを観察した。自然界の水温の変化を模して、6 月 30 日までは 22 °C、7 月 1 日～27 日までは 23 °C、7 月 28 日以降は 25 °C

に設定した。産卵基盤としては、イワガキの殻を入れた。その結果、9 月 3 日にイワガキ殻表面に産卵・卵嚢形成が観察できた(図 2A)。したがって、100 L の実験水槽でも条件がそろえば、レイシガイの産卵・卵嚢形成が起こることが判明した。

次に実験水槽内のイワガキ殻に産み付けられた卵塊に他のレイシガイが蝟集し、さらに産卵・卵嚢形成が起こるかどうかをタイムラプス撮影(2 秒で 1 枚)で調べた。その結果、このイワガキ殻への蝟集と新たな産卵が確認できた。レイシガイがいない状態でタイムラプスをセットし、最初にレイシガイがイワガキに蝟集を始めた時間を 0 としたところ、最初の新たな卵嚢を確認するまでに 21 時間半を要した。その後 40 時間後まで記録したが、その時点でもこのイワガキ殻への蝟集は継続していた。このことからレイシガイの産卵・卵嚢形成には約 1 日必要で、新たな卵塊は、2 日間程度は他のレイシガイを誘引することができると思われた(図 2B, C)。

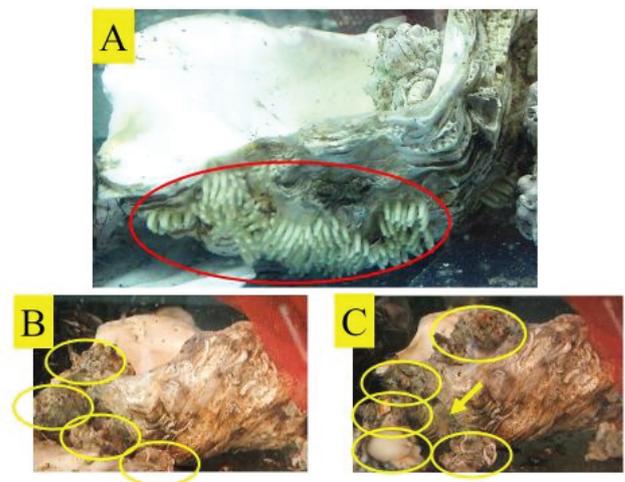


図 2 実験水槽内での産卵・卵嚢形成

A: 実験水槽(100 L)中でイワガキ殻に 9 月に産み付けられた卵塊(赤丸中), B: タイムラプス撮影中にイワガキ殻に蝟集(黄色丸中)が観察された(0 時とする), C: タイムラプス撮影 21 時間半後に産卵が確認された。

ついで、自然界で得られた卵塊(色が黒くなり始めていたため、10 日以上経過、岡野ら, 2015)を切り分け、生体用瞬間接着剤(医療用アロンアルファ)でガラス板、プラスチック板、プラスチックでできた虫かご底部に接着させ、この卵塊に蝟集・産卵するかどうかを調べた(図 3)。

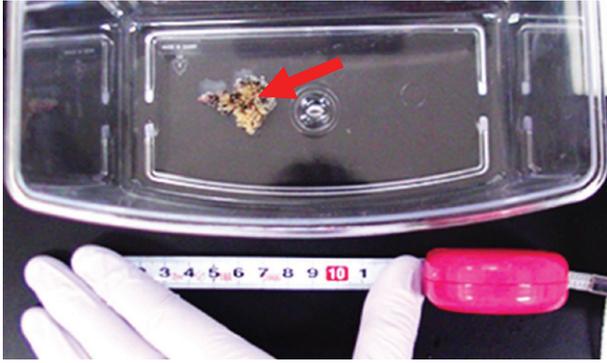


図3 卵塊固定実験

自然界でとれた卵塊の底部の接着面に生体用アロンアルファを塗り、プラスチックの虫かごに固定したところ。

ガラス板や虫かごを用いた理由は、もし透明で移動可能なところに産卵や卵嚢形成を誘導できれば、あらゆる角度から産卵の全プロセスをタイムラプスマービーで記録できると考えたためである。しかし、アロンアルファで固定した卵塊は徐々に死んでいったこと、ガラス板やプラスチック板が動いてしまうことなどの難点もあり、結局、小卵塊を貼り付けたガラス板、プラスチック板、虫かごに対しては顕著な蟻集も産卵も観察できなかつた。この実験から結論づけることは難しいが、産卵後 10 日程度時間の経過した卵嚢・卵塊は誘引能力がなくなっている可能性がある。言い換えれば、卵塊への誘引は産みつつあるレイシガイ、または産んだ直後の卵塊にのみ誘引作用があるのかもしれない。卵嚢形成が卵塊の周辺部分に起こり、次々と集団が大きくなることを考えれば、そのような仕組みが存在する可能性は大いにある。

実験水槽内で産卵が観察できることが明らかになったため、その再現性を確認するために実験 2 を行った。実験期間は 11 月 17 日～2 月 12 日で、2015 年度に未産卵のレイシガイ (150 個体) を 100 L 水槽に入れ、餌のムラサキイガイを大量に与え、水温を 23~25 °C にして観察した。その結果 1 月 18 日にイワガキ殻に産卵・卵嚢形成を確認した。この実験から、その年に未産卵の個体群であり、餌が十分で水温が適当であれば、全く産卵シーズンでない場合でも、産卵・卵嚢形成を誘起でき、それが連鎖的に広がって卵塊をつくることが明らかとなった (図 4)。

このイワガキ殻への産卵はどんどん広がり、ほぼ一面に (表面、裏面とも) 卵塊が形成された (図 4)。さらにイワガキ殻だけでなく、アワビの殻、ムラサキイガイの殻への産卵・卵嚢形成が見られた。この現象が産卵を一気に誘起させる液性因子によるものなのか、単なる偶然なのかは現時点で不明である。



図4 季節はずれの 1 月に形成された卵塊

卵塊に集まるレイシガイの雌雄比

卵塊に集まってくるのは、産卵の準備が整った雌の成熟レイシガイなのだろうか。その疑問に答えるため、実験 2 においてイワガキ殻の卵塊に蟻集したレイシガイを解剖し、その雌雄比をペニスの有無と卵巣の発達の 2 点を指標に確認した (図 5)。

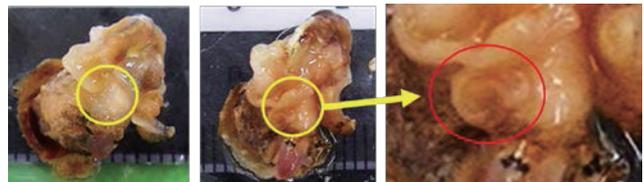


図5 レイシガイの雌雄判別

左：レイシガイの雌にはペニスがない。中央：レイシガイの雄はペニスがある。右：中央の図の拡大 (赤丸の部分にペニスが見られる)。

その結果、イワガキ殻に蟻集していたレイシガイの性比は雄 13 個体、雌が 19 個体であった。同様に自然界の卵塊に蟻集していた 44 個体 (エタノールで固定し、冷凍庫内で保存) について、雌雄比を調べたところ、雄 21 個体、雌 23 個体であった。当初、卵塊に蟻集する個体は産卵のために集まる雌個体だと推測していたが、実験結果はその仮説を否定し、雄雌比はほぼ 1:1 であった。産卵中の雌、または形

成直後の卵囊が何らかのケミカルシグナルを放出すると考えた場合、それは雄・雌に関係なく誘引していると思われる。このことから卵塊への蟻集は産卵のためというより、交尾・受精を促すなど別の理由によると思われる。

レイシガいの卵囊形成器官の解剖・単離法の開発

産みつつあるレイシガイが何らかの誘引因子を放出する、または新たに形成された卵囊から蟻集を引き起こす誘引因子が放出されているとすると、卵囊形成器官または、その付属器官が誘引因子を放出している可能性がある。また、ミゾコブシボラ（大型の食用巻貝）などの研究から、卵囊（egg capsule）がきわめて興味深い物性を持つタンパク質性の素材であることが明らかにされている（Rapoport & Shadwick, 2007）。従って、レイシガいの卵囊も新素材研究を行う上で興味深い対象と考えられる。レイシガいの卵囊の構成要素もミゾコブシボラと同様、タンパク質性と仮定した場合、その遺伝子の配列を明らかにするには、卵囊形成にかかわる器官を単離し、次世代シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行うことはもっとも有効な手法のひとつである（Wasco *et. al.*, 2014 ; Ho *et. al.*, 2014）。一般的にイカや巻貝における卵囊形成器官は egg capsule gland または nidamental gland（包卵腺）と呼ばれ、産卵期の雌に特に発達した器官である。そこで、レイシガいの卵囊形成器官の同定と迅速な単離法について検討した。

まず、内部を傷つけず、レイシガいの殻を取り除く手法を検討した。その結果、硬くごつごつしたレイシガいの殻を割るには小型の万力が適当であるということが判明した（図 6A）。殻を割った後、軸の部分に張り付く貝柱を解剖用ナイフで丁寧に除去することで、いわゆる剥き身となった内部を殻から遊離できるようになった。

ついで、赤褐色のエラと外套膜（図 6B）、残りの貝柱、および各器官を覆う膜を、解剖バサミを用いて丁寧に切除することで、卵巣から足にいたる全体像を平面的に観察できるようになった。卵塊が産み付けられたイワガキ殻に蟻集していた雌と雄のレイシガイをこの方法で解剖した標本の比較写真を図

6C に示す。左が雌で、赤丸で囲った部分が雌で顕著に発達した部位があり、雄（右の青丸）ではこの部位が欠如していた。この部位は文献（Rapoport & Shadwick, 2007）の egg capsule gland が存在する部位とほぼ一致している。この部位は解剖バサミとメスを使って、容易に他の部位と分けて、ほぼ純粋な形で単離できた。

今後、この部位の時間的な変化や組織化学的な研究を行い、この部位が egg capsule gland であることを証明する必要があるとはいえ、卵囊形成を研究する糸口をつかんだことは確かと思われる。

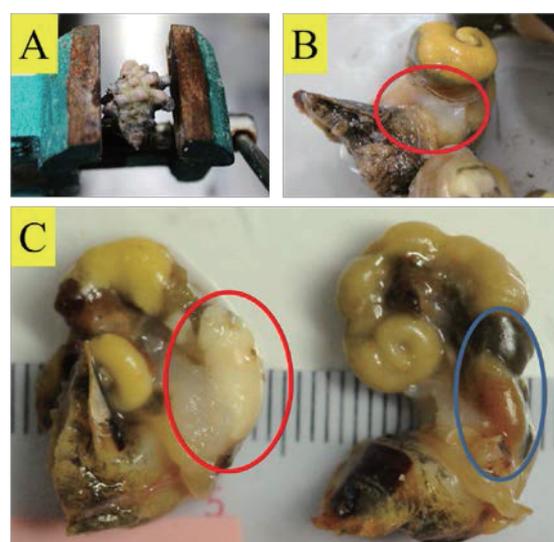


図6 レイシガいの解剖

A : 万力で殻を丁寧に壊しているところ。B : 貝柱（赤丸の白い部分）を除くと剥き身の本体を単離できた。C : イワガキ殻に蟻集した雌（左）と雄（右）のレイシガイの比較。雌には白く見える顕著な器官があり、形態と部位から卵囊形成器官（egg capsule gland）と思われる。

結論と将来展望

本研究により、秋田県立大学に設置した 100 L の実験水槽内でレイシガいの産卵・卵囊形成が観察できるようになった。また卵囊形成に関与すると思われる器官（egg capsule gland）を同定し、単離する技術を取得した。まさに産みつつあるレイシガいの egg capsule gland では、卵囊を構成するタンパク質遺伝子群、および卵囊の前駆タンパク質が高発現して

いるはずである。したがって、この器官のトランスクリプトーム解析, プロテオーム解析を行うことで、レイシガイの卵囊の組成や形成機構を調べることが可能となった。また、卵塊に蝟集する要因を探索する上で重要な遺伝子群や誘引因子が濃縮されている可能性もある。この可能性も調べていく予定である。

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成 27 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., *et al.*, (2010). A molecular phylogenetic framework for the Muricidae, a diverse family of carnivorous gastropods, *Mol. Phylo. Evol.*, 1025-1039.
- Ho, K.K., Leung, P.T., Ip, J.C., Qiu, J.W., & Leung, K.M, (2014). *De novo* transcriptomic profile in the gonadal tissues of the intertidal whelk *Reishia clavigera*. *Mar. Pollut. Bull.*, 85(2): 499-504.
- 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, 蝟集, 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.
- 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 28 年 7 月 20 日受付〕
〔平成 28 年 7 月 31 日受理〕

A reproductive study of the carnivorous sea snail, *Thais bronni* (Reishigai): Egg capsule formation under laboratory condition and dissection of the egg capsule gland

Keiju Okano¹, Yuya Matui¹, Daishiro Matsuyama², Nobuyasu Nakabayashi², Junichi Yamada²,
Wong Yue Him¹, Mieko Oguro-Okano^{1,3},

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University,

² Akita Prefectural Institute of Fishery, ³ Yamazaki Gakuen University

Rock oyster is one of the Akita's gourmet foods in summer. However, the recent decline of rock oyster resources is distinct and is related to the predation by the carnivorous sea snail *Thais bronni* (Reishigai). Avoiding predation of juvenile rock oyster by Reishigai is therefore an urgent issue in Akita Prefecture. In the natural environment in summer, Reishigai produces egg mass complex composed of thousands of cylindrical egg capsules. Each of them contains hundreds of eggs. Conspecific adults tend to swarm around the egg mass. We are interested in how the egg capsule are formed and what causes the swarming of conspecifics around the egg mass. To characterize the egg capsule formation process and the swarming behavior, we developed the experimental system in a 100L indoor aquarium. Unspawned Reishigai were found to lay eggs when they were cultured under the appropriate temperature (23-25 °C), given the appropriate food (*Mytilus galloprovincialis*) and spawning substrata. Using this system, we observed multiple egg-laying events in September and January. Interestingly, once an individual started to lay several egg capsules, conspecifics swarmed around the newly laid egg capsule and initiated the egg-laying process, as found in the natural environment. The male/female ratio of the snail swarming around the egg mass is about 1:1, suggesting that the swarming episode not only triggered egg laying event in female, but may also promote mating and/or certain unknown reproductive events. We also developed a quick method to dissect the egg capsule gland (nidamental gland), which is essential to the subsequent transcriptomic and proteomic analyses for understanding the molecular nature of egg capsule materials.

Keywords: carnivorous sea snail, *Thais bronni*, rock oyster, swarming behavior, egg sac, Reishigai