

放卵放精型のサンゴにおける 受精(1) —ミドリイシ属サンゴを中心に—

守田 昌哉*

日根弓太郎

大木 駿

琉球大学熱帯生物圏研究
センター瀬底研究施設

Fertilization in the broadcast spawning coral Acroporidae. I

M. Morita* · Y. Hine · S. Ohki

*E-mail: morita@lab.u-ryukyu.ac.jp

●はじめに

ミドリイシ属サンゴは、種数が多く、特にインドー太平洋にはおよそ 100 種が生息している。その 35%は同所的に生息し、多くが同調して産卵する(Willis et al. 2006)。ミドリイシ属サンゴは同時的雌雄同体生物であり、産卵時に卵と精子をパックした配偶子バンドル(egg-sperm bundle)を放出する。バンドル内や同一群体由来の配偶子間での自家受精は起こらず、放出後に他家由来の配偶子間で受精が起きる(e.g. Heyward and Babcock 1986)。このことは、有性生殖をする生物では同種内での他家受精が子孫の遺伝的多様性を生み出し、環境への適応や近親交配による近交弱勢を防ぐことに関与するという説と矛盾しない(Goodwillie et al. 2005; Stebbins 1957)。複数種が同調して産卵するため、同種由来の配偶子を認識して受精するメカニズムも重要となる。今回は、同調性産卵と深く関係する配偶子の種認識を議論する。

●同調性産卵と配偶子認識機構の関係

ミドリイシ属サンゴの産卵において特筆すべきは、複数種の同調した産卵であろう。中でもオーストラリアのグレートバリアリーフの一部で見られる大規模同調産卵(mass-spawning)では 100 種以上にのぼるミドリイシ属サンゴが同調して産卵すると報告されている(Babcock et al. 1986)。このような大規模な一斉産

卵はグレートバリアリーフの一部などで限局的に見られるのみで、他の地域では限られた複数種の同調した産卵(multi-species spawning)程度に留まると考えられている(Baird et al. 2009)。

ミドリイシ属サンゴは産卵同調性が高いため、自家受精ならびに異種間交配を防ぐためには、同じ種で他家由来の配偶子を認識する機構が必要である。この認識機構を、種に関しては種認識、自家受精を防ぐ認識を自己/非自己認識として区別して扱うことにする。特に後者は、バンドルを構成する卵と精子とが非常に接近しているため、重要である。

●種認識

インドー太平洋に生息するミドリイシ属サンゴでは、サンゴの交雑体(雑種体)が明確には確認されていないことから、配偶子の種認識がしっかりしており受精の種特異性が高いと思われる。過去の研究により、試験管内(*in vitro*)の異種交差は決まった種間でしか起きず、様々な種で受精の種特異性が示されている(Hatta et al. 1999; Wei et al. 2012; Willis et al. 1997; Wolstenholme 2004)。しかし、その一方で異種交差する種も報告されており、*in vitro* ではインドー太平洋に生息する 1/3 の種間で交差するとされる(reviewed by Willis et al. 2006)。そのうちのいくつかの組み合わせでは、それぞれの種の形態的特徴をもった中間形

態の群体が発見されており、野外での交雑および雑種形成が示唆されている(Hatta and Matsushima 2008; Isomura et al. 2013)。また、カリブ海では、同調して産卵する種間において実際に野外で交雑が生じることも明らかにされている(Fogarty et al. 2012; Vollmer and Palumbi 2002)。

このような事実は、同調産卵後に異種間で配偶子が交雑すれば、交雑体が形成されることを示しているが、交雑体が活発に配偶子形成を行なうかどうかについては未解明な点も多く、子孫が交雑する形質を保持するのかは疑問である。何故なら、カリブ海の交雑体は殆どが子孫第一世代(F1)であり、有性生殖による他家交配が稀であることが示されているからである(Vollmer and Palumbi 2002)(一方で、遺伝子流入が有ることから有性生殖が全く起きていないという訳でもなさそうである: Palumbi et al. 2012)。従って、F1 雑種体が配偶子形成能を持たない場合、このような雑種を形成する形質、すなわち異種間で交差するという性質は、集団内で消失していく傾向にある筈だが、現実には保持している種がいる理由は何であろうか？

可能性として、1)同調産卵しない種間では、配偶子そのものが交雑する機会が無く種認識が形成されない、2)異種の配偶子だけしかない時には異種間で受精を行なうが、同種の配偶子が混在した状態では同種間で優先的に受精が起きる、の2つの可能性が考えられる。1)に関しては、野外における産卵日および時刻が交雑する種間で大きく異なるか比較すれば良く、2)に関しては、同種と交差する異種の精子を混在させた条件下で受精の様子を検討すれば良いと考えられる。

●同調産卵しない種の種認識

はじめに同調して産卵しない種の配偶子の“種”認識(以下、配偶子認識)に関して議論したい。*in vitro*

で配偶子が交差することは、多くの種で報告されているが(Fukami et al. 2003; Hatta et al. 1999; van Oppen et al. 2002; Willis et al. 1997)、太平洋の *Acropora aspera* グループでは、配偶子が交差する種間で産卵時刻のピークに60分かそれ以上のずれがあり、野外においては頻繁に交雑が起きないのではないかと推察されている(van Oppen et al. 2002)。また、沖縄県阿嘉島での研究例では、交差する *A. florida* と *A. intermedia* そして *A. tenuis* と *A. donei* の産卵日および産卵時刻が一致することが多い(Fukami et al. 2003; Isomura et al. 2013)が、沖縄本島の瀬底島周辺では、これらの種の産卵の同調性は低く、*A. florida* と *A. intermedia* は、多くの場合で異なる日に産卵しており(図1)、また、そもそも産卵する群体数が少く、交雑の機会も頻繁ではないようである。実際に、

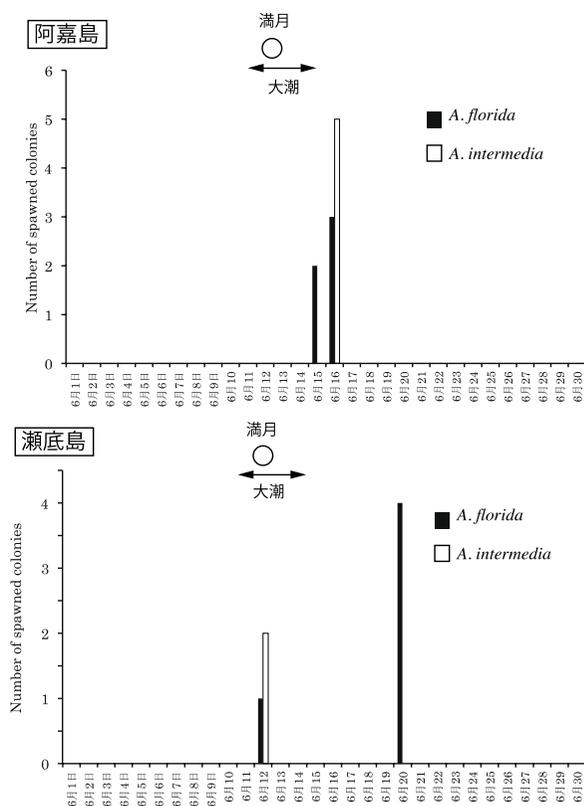


図1 *Acropora florida*(黒いバー)および *A. intermedia*(白いバー)の阿嘉島および瀬底島における産卵日(2014年)

筆者が、お互いの配偶子が交差性を示す *A. tenuis* と *A. donei* について瀬底島で調査したところ、*A. tenuis* の産卵する 5~6 月に、配偶子を保持している *A. donei* の群體を見つけることは出来なかった。従って、配偶子が交差する種間では、産卵同調性が低く、異種間での配偶子の相互作用が稀である可能性がある。言い換えると、産卵日が異なる種間では、配偶子が相互作用する機会が無いため、お互いの種を認識する機構が必要とならないと考えられる。

それでは、遺伝的に近縁で産卵同調性が低い種間では交差性が高いのであろうか？ 筆者らは、*A. digitifera* とその隠蔽種である *Acropora* sp. 1 (Hayashibara) (林原 1995) を用いてこの検証を行なった(図 2a)。この 2 つのグループは沖縄本島周辺において産卵期が 2 ヶ月異なり、*A. digitifera* が 6 月、*Acropora* sp. 1 が 8 月に産卵し (Hayashibara and Shimoike 2002; Ohki et al. 2015) (図 2b)、両者は遺伝的に個別の集団を形成している (Nakajima et al. 2012)。この 2 グループでは形態も異なっており、群體

の枝長、太さ、そして頂端ポリプのサイズに有為な差があることが判明した(図 2c; Ohki et al. 2015)。つまり、この 2 つのグループは別の種とすべきである。これらの種の成り立ちを考えると、おそらく、6 月に産卵する共通祖先種から 8 月に産卵するグループが派生し、6 月に産卵する *A. digitifera* と 8 月に産卵する *Acropora* sp. 1 に種分化したのであろう。この“2 種”間では産卵期の相違により野外で配偶子が交雑する機会はずがないため両種の配偶子が相互に作用することがなく、これらの配偶子認識に違いは生じていないと推察される。すなわち、先の仮説に沿って考えれば、両種の配偶子を混在させれば交差する筈である。

そこで、産卵期の異なるこの *A. digitifera* と *Acropora* sp. 1 の間での配偶子の交差性を検討するために、筆者のグループでは、精子の凍結保存法を開発し、これらの受精の可否を検討した。今回は、この時開発した精子の凍結保存法に関しての詳しい説明は割愛するが、ショ糖とメタノールを凍結保護試薬にして、精子を液体窒素中で保存すると高い受精能を維持したまま

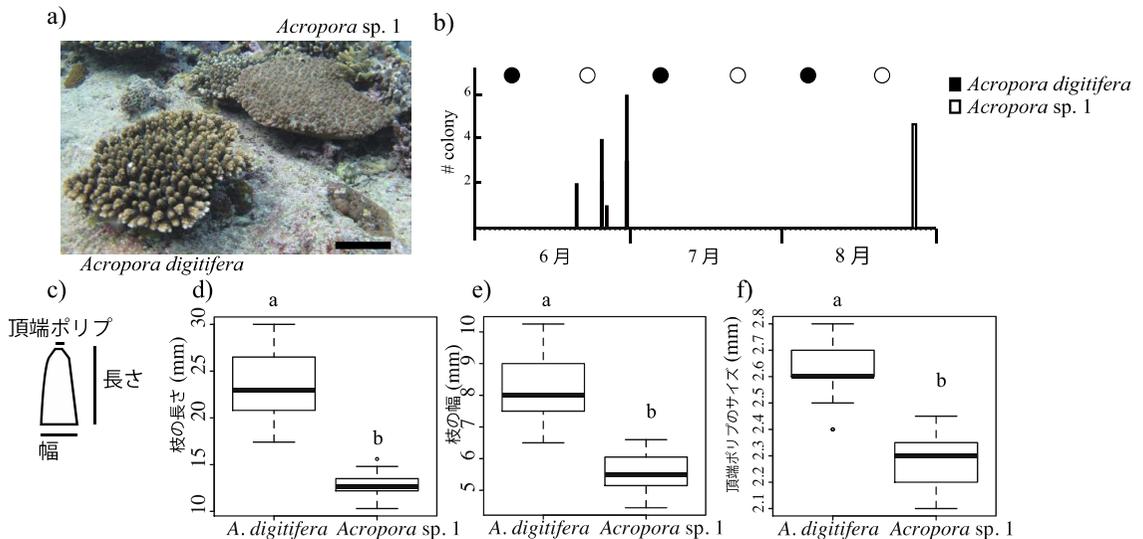


図 2 *Acropora digitifera* と *Acropora* sp. 1 の形態と産卵期の違い

(a) 同所的に生息する *A. digitifera* と *Acropora* sp. 1 (スケールバー 10 cm) の群體。(b) 2013 年の *A. digitifera* と *Acropora* sp. 1 の産卵日 (満月 (○) および新月 (●) をグラフ上部に示す)。(c) 形態比較に用いた *A. digitifera* と *Acropora* sp. 1 の形質。*A. digitifera* と *Acropora* sp. 1 (各 5 群體) を (d) 枝の幅、(e) 長さ、(f) 頂端ポリプの直径で比較した結果 (two-sample t-test を行い検定した)。

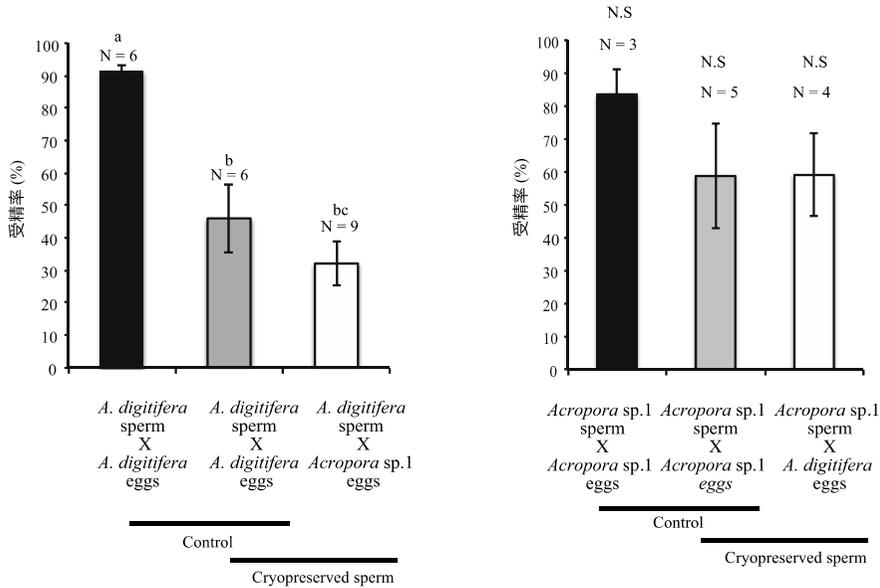


図3 凍結精子を用いた *Acropora digitifera* と *Acropora* sp. 1 の配偶子の交差性

黒いバーは intact 精子を用いた同種間交配、灰色のバーは凍結保存精子を用いた同種間交配、そして白いバーは凍結保存精子を用いた異種間交配を示す。N は交配を行った数を示す。各群の差を検定するために Tukey HSD test を行なった。a vs b : $P < 0.05$, a vs c : $P < 0.005$, N.S. : 有意差無し。

長期間保管出来ることが判明した(Ohki et al. 2014)。この方法により液体窒素中で保存した精子を用いて配偶子の交差性を検討したところ、*A. digitifera* と *Acropora* sp.1 で両方向性の高い受精率を示した(図3)。更に、異種間同士の受精率が同種内の受精率と差が無かった(図3)。従って、これらの2種間では配偶子認識に違いが無いことが考えられた。以上の結果は、*A. digitifera* と *Acropora* sp.1 では、産卵時期がずれてから配偶子の相互作用の機会が無かったため、お互いの種の配偶子を区別する認識機構が出来上がらなかった可能性を示している。つまり、仮説のとおり、共通祖先から配偶子認識が変化しなかったと考えられるのである。

●種認識機構の形成

それでは、これまでに報告されている配偶子が交差性を示す種も遺伝的に近縁なのであろうか？ 配偶子が交差することが報告されている *A. hyacinthus* と *A. cytherea*, *A. tenuis* と *A. donei*, *A. cervicornis* と *A. palmata*, *A. florida* と *A. intermedia*, そして *A. digitifera* と *Acropora* sp.1 を対象に Gene bank に登

録されている Pax-C 配列を用いて系統関係を解析した。その結果、配偶子が交差する種はその多くが共通祖先から種分化している可能性が考えられた(Ohki et al. 2015)。ミドリイシ属サンゴでは雑種種分化などにより網目状に種分化が起きていると仮説があるため(Veron 1995)、1つの遺伝子座でミドリイシ属の系統を結論づけられないが、配偶子が交差する種間は系統的に近縁のようである。

配偶子が交差するのは、近縁である上、配偶子が相互作用する機会(≒同調した産卵)が見られないためであろうと考察したが、逆の見方をすると、ある2つの種が共通祖先から種分化するとき、お互いの配偶子が相互作用する機会があると、それぞれの配偶子を認識する機構が形成されることが考えられる。この仮説は、近縁で他のミドリイシ属サンゴの産卵しない時期に産卵する種間で比較すると、検討しやすいだろう。

それに、適した材料として *A. divaricata* がある。瀬底島では *A. divaricata* は9月に産卵し、2015年9月に瀬底島周辺に生息しているおよそ20種のミドリイシ属サンゴについて配偶子形成を確認したが本種以外では配偶子は形成されていなかった。*A. divaricata* には、

枝の太いタイプと細いタイプの2つの形態タイプがあり、今回はそれぞれ *A. divaricata*-robust と *A. divaricata*-slender とした(図 4a, b)。両タイプをそれぞれ 5 群体採捕して産卵日を確認したところ、産卵日のピークが異なっていた(図 4c)。2015 年 9 月 8 日に robust タイプ 5 群体と slender タイプ 1 群体が産卵した。産卵時刻は 2 タイプとも一致しており、21:00~21:15 の間にバンドルを放出した。この時産卵しなかった slender タイプの 4 群体はおよそ半月後の 9 月 24 日の

21:00~21:30 に産卵した。9 月 8 日には、野外に生息する robust タイプの群体(N=3)でバンドルのセッティング(放出直前のバンドルが口付近にせり上がる現象)が確認されたため、野外でも産卵が起きたと考えられた。

この 2 グループの配偶子について検討した結果、交差性に違いがあった。robust タイプの卵は、タイプ内の交配と同様に slender タイプの精子とも高い受精率を示した(図 4c)。それに対して slender タイプの卵では、

a) Slender type



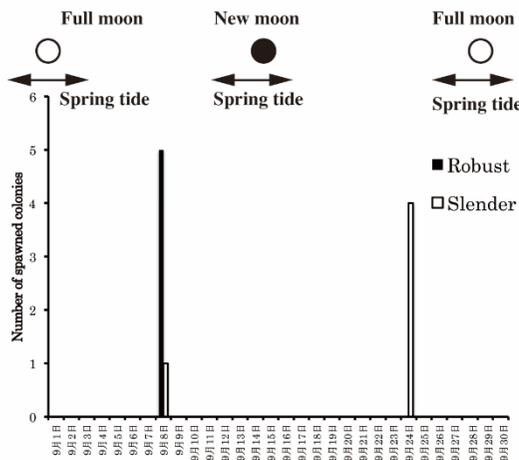
bar 5 cm

b) Robust type



bar 5 cm

c)



d)

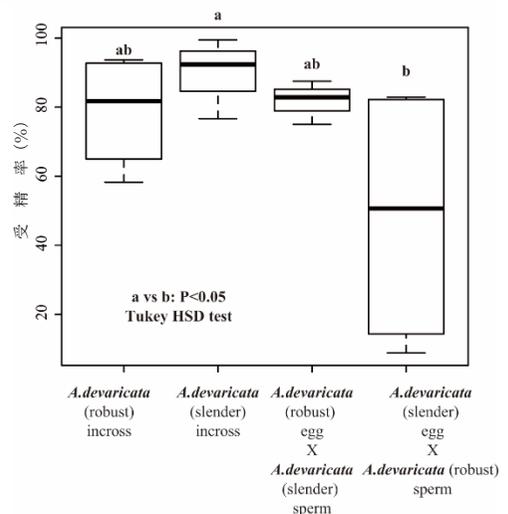


図 4 瀬底島に生息する 2 形態の *Acropora divaricata* の産卵日と配偶子の交差率

Acropora divaricata の slender タイプ(a)と robust タイプ(b)の群体と 2 形態の産卵日の違い(c; 白いバーは slender タイプ、黒いバーは robust タイプ、矢印は大潮の期間を示す)。2 形態の形態内および形態間の受精率(d; 有意差を検定するために Tukey HSD test を行なった。N= 5 trials)。

robust タイプの精子との受精率が、同一タイプの精子とに比べて有為に低かった(図 4d)。この 2 グループの配偶子の交差性の違いは、配偶子の相互作用する機会の違いによるものと考えられた。何故なら、9 月 8 日に 2 タイプとも産卵したものの、この日は robust タイプのピークではあったが、slender タイプのピークではなかった。従って、海中には robust タイプの配偶子は多かったが、slender タイプの配偶子は少なかったと推察される。言い換えると、robust タイプの配偶子は slender タイプの配偶子と出会う機会が少なく、特別に識別しなくとも多くの配偶子が同一タイプ内で受精できたであろうが、slender タイプは逆に robust タイプの配偶子と出会う機会が多く、同一タイプ内での受精を多くするためには、同一タイプから放出された配偶子を認識する必要があったということになる。つまり、robust タイプには厳密な認識機構は必要ないが、slender タイプでは、小規模の産卵が robust タイプのピークと重なるため、より厳密な認識が必要となると考えられるのである。

●配偶子の選択性:むすびに代えて

これまで、遺伝的に近縁で産卵同調性の低い異種間では配偶子の交差性が高くなることを考察してきたが、一方で、カリブ海のミドリイシ属サンゴは産卵が同調するにも関わらず、配偶子の交差性が高く、野外で交雑も起きており(Fogarty et al. 2012 ; Vollmer and Palumbi 2002)、これまで考察してきた産卵の同調性と配偶子の交差性の関係とは矛盾する。しかし、産卵の同調性のみで、配偶子認識の進化を結論づけるのは難しい。野外では複数種由来の配偶子が混在した状態で受精するため、配偶子はその状況下において異種間で交雑するかを評価することによって議論を深めることができるであろう。つまり、同調した産卵を行なう種間での精子選択実験が必要となる。

配偶子が交差性を持っていても、適切な精子濃度条件下では、異種間よりも同種の配偶子同士で選択的に受精するようである。例えば、配偶子が交差する *A. millepora* と *A. pulchra* では、精子が混在した条件下において、同種の精子と優先的に受精することがわかっている(Willis et al. 2006)。一方でカリブ海に生息する *A. cervicornis* と *A. palmata* では、*A. cervicornis* の卵は同種の精子とはもちろん *A. palmata* の精子とも受精するが、*A. palmata* の卵は選択的に同種の精子と受精する(Fogarty et al. 2012)。すでに述べたように、*A. cervicornis* と *A. palmata* の交雑体が野外に生息しているが、遺伝子流動は *A. palmata* から *A. cervicornis* に一方向的に起きていることがわかっており(Palumbi et al. 2012)、これは *A. cervicornis* の卵のみが *A. palmata* の精子を受け入れるため(Fogarty et al. 2012)、精子由来の *A. palmata* の遺伝子が *A. cervicornis* へと流入するためと考えられる(Palumbi et al. 2012)。この事実は、交差性があっても、同種の精子が混在した中で交雑が生じなければ、野外で雑種体は生まれないことを示している。

刺胞動物門に属するサンゴにおいて、配偶子が交雑する形質を持ち続けている理由は何であろうか？ ウニでは、種認識に関与する精子頭部の先体に位置する *bindin* の遺伝子型が受精環境に適応するために、集団内の遺伝子頻度が僅か 300 年で変化したと考えられている(Levitan 2012)。こうした交雑機構が受精環境に対して早い速度で変化して行く事象を考慮すると、サンゴがその長い歴史のなかで交雑能を持ち続けていることには、何らかの理由があるように思われる。今回は、この点を議論するために、配偶子選択実験による配偶子認識機構に関する議論を行ないたい。

●引用文献

Babcock RC, Bull GD, Harrison PL, Heyward AJ, Oliver JK, Wallace CC, Willis BL (1986)

-
- Synchronous spawnings of 105 scleractinian coral species on the Great-Barrier-Reef. *Marine Biology* 90: 379-394
- Baird AH, Guest JR, Willis BL (2009) Systematic and biogeographical patterns in the reproductive biology of scleractinian corals. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 40: 551-571
- Fogarty ND, Vollmer SV, Levitan DR (2012) Weak prezygotic isolating mechanisms in threatened Caribbean *Acropora* corals. *PLoS ONE* 7 e30486
- Fukami H, Omori M, Shimoike K, Hayashibara T, Hatta M (2003) Ecological and genetic aspects of reproductive isolation by different spawning times in *Acropora* corals. *Marine Biology* 142: 679-684
- Goodwillie C, Kalisz S, Eckert CG (2005) The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence theoretical explanations and empirical evidence. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 36: 47-79
- Hatta M, Fukami H, Wang W, Omori M, Shimoike K, Hayashibara T, Ina Y, Sugiyama T (1999) Reproductive and genetic evidence for a reticulate evolutionary history of mass-spawning corals. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1607-1613
- Hatta M, Matsushima K (2008) Presumed natural hybrids between *Acropora donei* and *Acropora tenuis*. *Galaxea* 10: 91-92
- 林原 毅 (1995) 慶良間列島阿嘉島周辺の造礁サンゴ類とその有性生殖に関する生態学的研究. 博士論文, 東京水産大学. 123p
- Hayashibara T, Shimoike K (2002) Cryptic species of *Acropora digitifera*. *Coral Reefs* 21: 224-225
- Heyward AJ, Babcock RC (1986) Self- and cross-fertilization in scleractinian corals. *Marine Biology* 90: 191-195
- Isomura N, Iwao K, Fukami H (2013). Possible natural hybridization of two morphologically distinct species of *Acropora* (Cnidaria Scleractinia) in the Pacific: fertilization and larval survival rates. *PLoS ONE* 8 e56701
- Levitan DR (2012) Contemporary evolution of sea urchin gamete-recognition proteins: experimental evidence of density-dependent gamete performance predicts shifts in allele frequencies over time. *Evolution* 66: 1722-36
- Nakajima Y, Nishikawa A, Iguchi A, Sakai K (2012) The population genetic approach delineates the species boundary of reproductively isolated corymbose acroporid corals. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 527-31
- Ohki S, Kowalski RK, Kitanobo S, Morita M (2015) Changes in spawning time led to the speciation of the broadcast spawning corals *Acropora digitifera* and the cryptic species *Acropora* sp. 1 with similar gamete-recognition systems. *Coral Reefs* 34: 1189-1198
- Ohki S, Morita M, Kitanobo S, Kowalska AA, Kowalski RK (2014) Cryopreservation of *Acropora digitifera* sperm with use of sucrose and methanol based solution. *Cryobiology* 69: 134-139
- Palumbi SR, Vollmer S, Romano S, Oliver T, Ladner J (2012) The role of genes in understanding the evolutionary ecology of reef building corals. *Evolutionary Ecology* 26: 317-335
- Stebbins GL (1957) Self fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist* 91: 337-354
- van Oppen MJ, Willis BL, van Rheede T, Miller DJ (2002) Spawning times reproductive compatibilities and genetic structuring in the *Acropora aspera* group: evidence for natural hybridization and semi-permeable species
-

-
- boundaries in corals. *Molecular Ecology* 11: 1363-1376
- Veron JEN (1995) *Corals in space and time*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA. 321pp
- Vollmer SV, Palumbi SR (2002) Hybridization and the evolution of reef coral diversity. *Science* 296: 2023-2025
- Wei NV, Hsieh HJ, Dai CF, Wallace CC, Baird AH, Chen CA (2012) Reproductive isolation among *Acropora* species (Scleractinia: Acroporidae) in a marginal coral assemblage. *Zoological Studies* 51: 85-92
- Willis BL, Babcock RC, Harrison PL, Wallace CC (1997) Experimental hybridization and breeding incompatibilities within the mating systems of mass spawning reef corals. *Coral Reefs* 16: S53-S65
- Willis B L, van Oppen MJH, Miller DJ, Vollmer SV, Ayre DJ (2006) The role of hybridization in the evolution of reef corals. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 37: 489-517
- Wolstenholme JK (2004) Temporal reproductive isolation and gametic compatibility are evolutionary mechanisms in the *Acropora humilis* species group (Cnidaria; Scleractinia). *Marine Biology* 144: 567-582

放卵放精型のサンゴにおける受精(1):ミドリイシ属サンゴを中心に

守田昌哉・日根弓太郎・大木 駿

(琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設)

要旨

ミドリイシ属サンゴは沖縄沿岸海域のサンゴ群集を形成する主立った属である。このミドリイシ属サンゴは複数種が同調して海中に卵と精子の複合体であるバンドル(egg-sperm bundle)を放出する。特にオーストラリアのグレートバリアリーフではおよそ 100 種のサンゴが同調して産卵する大規模な一斉産卵が見られる(Babcock et al. 1986)。この現象により多種の配偶子は海中で混在することになり、その中で同種内のみ、あるいは特定の種間のみでの受精を成功させるために、厳密に種特異的な配偶子認識が存在すると思われる。しかし、その詳細なメカニズム及び配偶子認識の進化と一斉産卵の関係性は不明なままである。本稿では、これまでの報告例及び現在進行中のミドリイシ属サンゴの受精に関する研究を紹介する。