

阿嘉島でのサンゴの交配実験

深見 裕伸

宮崎大学農学部
海洋生物環境学科

Crossing experiments using corals in Akajima Island

H. Fukami

E-mail: hirofukami@cc.miyazaki-u.ac.jp

●はじめに

阿嘉島臨海研究所を利用し始めて約 20 年となる。数年の空白期間はあるが、1995 年から 2016 年までほぼ毎年サンゴの産卵時期には阿嘉島において交配実験を行ってきた。著者が初めてサンゴの生殖の研究を行ったのは修士から博士課程の期間(1995～1999 年)であり、当時の慶良間海域はサンゴも豊富で多種多様な種が生息していた。この当時の交配実験のデータは、いくつかの論文として発表したものの、データ不足のため博士論文でしか取り上げられなかったデータも存在する。そこで、本稿では、これら未発表データを報告するとともに、研究成果および手法の現在までの変遷について述べる。

●ミドリイシ属の交配実験の過去と現在

研究を始めた 1995 年当時は、まだ 1998 年の大白化以前であり、阿嘉島では豊富なサンゴが見られた。交配実験を始めるにあたり、最も苦労したのが、ミドリイシ属の種の同定である。現在においても未だ種同定については自信を持つことができないが、当時は現在に比べて阿嘉島で見られる種の多様性が圧倒的に高く、さらに形態の類似した種が隣あって棲息していたため、どれが同種かを判断するのも難しく実験に用いる群体の採集が一苦労であった。群体の一部を採集してきては当時の研究員であった林原毅氏や下池和幸氏に教えを乞う毎日であった。この 1995 年、西平守孝

博士と J.E.N. Veron 博士による「日本の造礁サンゴ類」という図鑑が出版され(西平・Veron 1995)、その図鑑には種同定などで非常にお世話になった。ただ野外では 2 種の間形態を持つ群体も多く見られ、加えて Veron 博士がサンゴの網目状進化の仮説を提唱したこともあり(Veron 1995)、一斉産卵するミドリイシ属では交雑が繰り返り起こっているのだらうという思いに駆られて交配実験を行ったものである。

以下で述べる交配実験の手法に深くかかわってくるため、まずミドリイシ属の産卵様式について説明する。

阿嘉島では初夏の 6 月の満月周辺で多種同調産卵、いわゆる一斉産卵が起こることがすでに知られていた(満月が 5 月末のときは、5 月末と 6 月末の 2 回になるときもある)(Hayashibara et al. 1993 参照)。また、ミドリイシ属はすべて雌雄同体であり、卵数個と精子が一つの塊となったバンドルというものを産卵時に放出する。そして、産卵の 2 時間前には産卵前の準備段階として目視できるほどバンドルがポリプの口付近にまで現れる(バンドルのセッティング)。このバンドルのセッティングを確認することで、その日の産卵の有無を判断することが可能である。バンドル放出は、多くの種では 22 時以降であったが、ウスエダミドリイシ *Acropora tenuis* と *A. donei* に限り 19 時半頃に産卵することも知られていた(Hayashibara et al. 1993)。さらに、これら早い時間に産卵する種が産卵すれば、基本的にその後の遅い時間に産卵する種もその日に産卵するた

め、早い時間に産卵する種(現在もそうであるが、当時から *A. tenuis* が用いられている)のバンドルセッティングの確認が、一斉産卵の当日の前兆として認識されていた。ミドリイシ属は自家受精せず、他家受精のみであり、受精は 10^6 sperm/ml の精子濃度下において種内で 80%以上の受精率になることが実験的に実証されている(Willis 1999 et al. 1997; Hatta et al. 1999)。その後、2 時間程度で卵割が始まり発生が開始され、受精から 2 日目にはプラヌラ幼生へと発達する。

次に、交配実験の手法について述べる。1995～1999 年当時は、まだサンゴの交配実験が世界的にも始まったばかりであり、交配実験の方法も現在のように単純化されておらず、試行錯誤を繰り返し手探り状態で進んでいた。

まず、最も違うのが、産卵前の群体の取り扱いである。現在では、採集してきた群体を研究施設内の流水水槽に置き、産卵バンドルのセッティングを観察しているのだが、当時は、施設の水槽では産卵時間や産卵日が野外とずれるとの考えから(結果的にはほぼずれがないことが判明している)、阿嘉漁港の水深 3m ほどの浅瀬に採集した群体を沈めておき、毎日 18 時と 21 時に海に潜ってバンドルのセッティングの有無をチェックしていた。ちなみに、採集は、満月の 3 日前までに野外において枝を少し折り、ピンク色の成熟した卵を持った群体を 30～50cm 幅(もしくは高さ)程度を採集した。それを港に沈めて、満月の 3 日前からセッティングの有無のチェックを開始し、産卵するまで続けていたのだが、満月を過ぎてもなかなか産卵しないときもあり、毎日のように今日こそ産卵するはずだという思いで毎晩港に潜っていたのが良い思い出である。バンドルのセッティングが確認できた群体は、できるかぎり空気に触れないようにするため、海の中でバケツに一群体ずつつけていれ、それを実験室に持ち帰って産卵を待つ

た。また、電灯などの明かりの下では産卵時間が遅れると考えられ、それを避けるために暗室にサンゴの入ったバケツを置き、さらに産卵チェックには懐中電灯に赤いセロファンを被せることでできるかぎりサンゴへのストレスを避けるように非常に気を遣って実験を行っていた。現在はそこまで気を遣わずとも普通に産卵することが分かっており、暗室でなくともある程度の暗闇においておけば産卵も正常に起こり、また、よほど長時間当てなければ普通の懐中電灯を用いても問題はない。

産卵後は、10 ml ピペット(現在はパストツールピペットもしくはディスプレイの 1 ml ピペットを使用)を使って群体ごとにバンドルを容器に採取し、ピペッティングでバンドルを割ることで卵と精子を分離させた。産卵直後のバンドルは非常にしっかりと卵と精子がパックされているため、なかなか割れないのが難点である。当時は、できるだけ多くの卵と精子が必要とのことから、群体ごとに 1000 個以上もの大量のバンドルを採取していたが、現在では 200 個くらいのバンドル数で十分である(バンドル一つあたり、卵が 10 個前後である)。その後、卵と精子を別々に分けるのだが当時の手法では重労働であった。まず、バンドルを卵と精子に分離した後、水面に浮かんでいる卵をピペットで、できる限り精子が入らないように吸い取り、ろ過海水の入った別の容器に移す。ただし、この時点ではまだ多くの精子が混入しているため、この卵の洗浄をさらに 2 度 3 度と見ただけに海水が透明になるまで行う。この作業を 10 群体以上も同時に行わないといけないため、当時は 5 人以上で手分けして進んでいた。その頃に聞いた話では、阿嘉島の研究員の方々が一度メッシュを使って洗う方法を試したらいいのだが、そうすると卵がメッシュで傷だらけになるとのことからメッシュを使わなかった。しかし、近年、メッシュで卵をゆっくりと洗えば、卵を傷つけず発生も正常に生じることが判明したため、現在は目合い 80 μ m 径のメッシュを使って卵の洗浄をしている。

メッシュを使えば、洗浄が一度で済むため、非常に効率が良い。特に、現在使用しているのは、金魚すくい用の‘ポイ’の枠にメッシュを取り付けたものである。これは、台湾中央研究院の野澤洋耕博士が使用していたのを導入したものであるが、非常に使い勝手がよく有用である。卵の洗浄後は、それぞれの精子濃度を事前に測定し、 10^7 sperm/ml の濃度の精子懸濁液を準備した。精子の濃度は血球計算盤を使って行う。現在、学生にやってもらうとたまに濃度計算を間違えたりするが、当時、私も同様だった思い出がある。

群体ごとに卵と精子を分け、精子濃度測定が完了して、ついに交配実験の開始である。この前準備に 10 群体を扱うときには 5 人以上で 2 時間以上かかっていた。サンゴの産卵が夜 10 時に始まるため、深夜 0 時頃が産卵実験の開始である。現在は、卵の洗浄にメッシュを使うことで、一人でも 10 群体を 1 時間程度で準備可能である(慣れも必要)。交配実験の方法は現在とほぼ同じで、まず卵を、ろ過海水を満した容器に入れ、その後濃度調整した精子を最終濃度 10^6 sperm/ml になるように加える。実験に用いる容器だが、当時は 100 ml の大きなガラス瓶を使用し、そこに 50 ml のろ過海水を入れて実験を行っていた。現在は、密封できる 50 ml の検尿のカップが小型でバランスもよく非常に使い勝手が良いため、そのカップに 20 ml のろ過海水を入れて実験に使っている。もしくは、大量の交配実験を行う必要があるときは 6 穴のマルチウェルプレートを何枚も用意し、それぞれの穴に 5 ml 程度のろ過海水を入れても可能であるが、中の海水をこぼしやすいなど実験後の取り扱いが面倒である。交配実験では、当時は 1 容器あたり 500 個以上の卵を使っていたが、そこまで多くなくとも受精率が判断できるため、現在では 100~200 個程度である。

媒精後、卵割の有無が判明するまで室温 26°C の環境で最低 2 時間かかるため、ここで一時休憩となる。

ただし、2 時間くらいだとまだ卵割が始まっていないものもあるため、4 時間程度おいてから見るのが理想的である(正常なものも 8 細胞期以上になっている)。逆に、8 時間以上おくと未受精卵が崩壊し始めるため、受精率の判定が困難になる。そのため、それまでに受精卵と未受精卵の割合を調べる必要がある。1995 年当時は、発生段階が良くわからず、また肉眼では卵割の割合を判断することが難しかったため、顕微鏡下で受精卵を数える非常に根気がいる作業であった。さらに、卵を最低 100 個以上数えて、その中の受精卵と未受精卵の割合を調べるのだが、その時には時計皿に卵を移して、実体顕微鏡下で卵を観察していた。時計皿に 100 個以上も卵があるとどこを数えているかわからなくなり、何度も数えなおした思い出がある。慣れてくると、非常に早くできるようになるのだが、当初は一回のカウントに数十分かかっていた。この作業も当時は 5 人で手分けして行いほぼ徹夜作業であった。これで一通りの作業は終了である。その後、受精した卵のみを新たなろ過海水の容器に移し、プラナリア幼生になるまで飼育することで、発生が正常に行われているかを確認した。

これら一連の交配実験の技術は、その後、著者が携わることになるカリブ海でのタカクキクメイシ属 *Montastraea* (現、*Obricela*) 3 種での交配実験や日本温帯域での産卵実験の基盤となり、現在では再び阿嘉島でのミドリイシ属の交配(特に、雑種の交配)の研究に用いられ続けている。それぞれの地域で年に一度しか行われないサンゴの産卵について、種がどのように産卵し、受精しているのかを調べるには交配実験は非常に良い方法であり、さらに種間交雑の有無や隠れ種の探索にも有効である。私が知る限り、交配実験は世界的にほとんど行われておらず残念でならない。より多くの研究者が交配実験を多種多様な種で実行すれば、ミドリイシ属の生殖やさらには種分化といった

進化について解明が進むと思われるため、ぜひとも本実験の実行を推奨したい。

以下では、1999年までに得られた結果の内、博士論文(深見 2000)でのみ発表した、雑誌等に未発表であるものを中心に説明する。

●ミドリイシ属の種内交配および種間交雑

ミドリイシ属の産卵について特筆すべきことは、やはり一斉産卵より早い時間に産卵する種が当時知られていなかった *A. tenuis* および *A. donei* 以外にも5種発見できたことである。それらの内、4種は Fukami et al. (2003) において発表した、当時の種同定で *A. carduus-like*

表1 1995~1999年までの交配実験に用いたミドリイシ属(*Acropora*)の種と交雑の有無(深見 2000より引用)
受精率は平均値。種名は1999年当時のものを使用。

種名	交雑の有無および説明
<i>A. nasuta</i> -A	典型的な <i>A. nasuta</i> 。 <i>A. nasuta</i> -Cの精子(97%)、 <i>A. formosa</i> -Aの精子・卵(40~83%)、 <i>A. aculeus</i> の精子・卵(93%)と交雑。
<i>A. nasuta</i> -A'	<i>A. nasuta</i> -Aと形態的に区別不能だが、 <i>A. nasuta</i> -Aとは交配せず。 <i>A. microphthalmalma</i> の卵(95%)と交雑
<i>A. nasuta</i> -B	放射個体の形状が <i>A. nasuta</i> -Aと少し異なる。どの種とも交雑しない。
<i>A. nasuta</i> -C	<i>A. secale</i> もしくは <i>A. secale</i> の近縁種。 <i>A. nasuta</i> -Aの卵(97%)および <i>A. formosa</i> -Aの精子・卵(40~95%)と交雑。
<i>A. formosa</i> -A	現在の種名は <i>A. muricata</i> 。 <i>A. nasuta</i> -Aの精子・卵(40~83%)および <i>A. nasuta</i> -Cの精子・卵(40~95%)と交雑。 <i>A. microphthalmalma</i> の精子および <i>A. digitifera</i> の精子とも約10%の受精率で交雑。
<i>A. formosa</i> -B	放射個体の形状が <i>A. formosa</i> -Aと少し異なり、どの種とも交雑しない。分子系統的に <i>A. formosa</i> -Aと大きく異なる。 <i>A. muricata</i> ではない可能性が高い。再検討を要する。
<i>A. aculeus</i>	<i>A. nasuta</i> -Aの精子・卵と交雑(93%)。
<i>A. microphthalmalma</i>	<i>A. nasuta</i> -A'の精子と交雑(95%)。
<i>A. digitifera</i>	<i>A. pulchla-like</i> の精子・卵と交雑(12~34%)。 <i>A. formosa</i> -Aの卵とも多少交雑(11%)。
<i>A. pulchla-like</i>	<i>A. pulchla</i> と <i>A. digitifera</i> の中間形態。 <i>A. digitifera</i> の精子・卵と交雑(12~34%)。
<i>A. aspera</i>	交雑しない。
<i>A. millepora</i>	交雑しない。
<i>A. nobilis</i>	現在の種名は <i>A. intermedia</i> 。 <i>A. florida</i> の卵と交雑(21%)。
<i>A. florida</i>	<i>A. nobilis</i> の精子と交雑(21%)。 <i>A. gemmifera</i> の精子および <i>A. humilis</i> の精子とも2~6%の受精率で交雑。
<i>A. gemmifera</i>	<i>A. florida</i> の卵と2~6%の受精率で交雑。
<i>A. humilis</i>	<i>A. florida</i> の卵と2~6%の受精率で交雑。
<i>A. hyacinthus</i>	交雑しない。
<i>A. danai</i>	現在の種名は <i>A. abrotanoides</i> 。交雑しない。
<i>A. granulosa</i>	交雑しない。

とした種がデータ不足と判断したため、未発表のままである。

簡潔に説明すると、一斉産卵より早い時間に産卵する種は、産卵時間の違いによりさらに 2 グループに分けられる。一つは、日没直後の 19 時から 19 時半までに産卵する *A. tenuis*、*A. donei*、そして当時見つかった *A. yongei* と *A. carduus-like* である。*A. tenuis*、*A. donei*、*A. yongei* の 3 種は群体形は異なるものの放射個体の形態が皿状であり、Wallace(1999)でも同じ形態類縁グループとしてまとめられている。さらに分子系統的にも互いに区分できないほど近縁である。一方、*A. carduus-like* は放射個体が筒状であり、同時刻に産卵する他の 3 種と形態的に大きく異なっている。さらに、著者が行ったミニコラーゲン遺伝子のイントロン領域を用いた分子系統解析では、上記 3 種とは遺伝的に近縁であるものの、異なるクレードを作成していた。当時の種同定で *A. carduus-like* とした種は、骨格標本の行方が知れず、写真も古いものしかないため、正確な種名は現在不明だが、当時の写真(ただし、接写写真は無い)を見る限り *A. longicyathus* にも見える。今後、さらなる調査が必要であろう。ただし、2014 年以降、阿嘉島周辺において確認できないため、白化により消失した可能性が高い。

もう一つのグループは、上記 4 種の産卵から 30 分から 1 時間後に産卵する種であり、*A. austrea*、*A. verweyi*、*A. vaughani-like* の 3 種が含まれる。当時同定した *A. vaughani-like* も上記の *A. carduus-like* 同様に、骨格がないため、現在正確な種同定はできず、再調査が必要であろう。これら 3 種も遺伝的に同じクレードにまとめ、より早く産卵する上記 4 種とは遺伝的に異なるクレードを作成した。このように、産卵時間と分子系統的な違いが一致していることがあきらかとなった。これは進化的に産卵時間が異なることで種分化してきた、もしくは一度地理的に隔離後に産卵時間の

ずれが起こったことを示唆している。現在、*A. tenuis* 以外の種は、ほとんど注目されておらず、研究にはほぼ使われていないが、早い時間に産卵する種であるという認識が広がれば 22 時以降に見られる一斉産卵の確認のために利用できるだろう。

22 時以降の一斉産卵する種については、当時、18 種について種間交雑の有無を調べた(表 1)。ただし、Hatta et al. (1999) で報告した種以外は、1 種につき 1~2 群体しか実験に用いていないものもあり、データとしては不十分であると判断したため、これまで未発表であった。その中で興味深かったことは、18 種も用いたにも関わらず、種間でほぼ交雑が起こらなかったということである。結果的に、高い受精率で交雑がみられたのは、Hatta et al. (1998) で報告したように、*A. nasuta* の 2 つの形態型(*A. nasuta-A* および *A. nasuta-C*)と *A. formosa*(現、*A. muricata*)の 1 つの形態型(*A. formosa-A*: 現、*A. muricata*)のみであった。また、当時 *A. nobilis*(現、*A. intermedia*)と *A. florida* の組み合わせは、*A. florida* の卵と *A. intermedia* の精子の組み合わせで 20%と低い受精率であったが、以降の調査により、群体によって 90%近い受精率で交雑することが明らかとなった(Isomura et al. 2013)。それ以外では、*A. microphthalmia* と *A. nasuta-A'* および *A. nasuta-A* と *A. aculeus* の組み合わせでも高い受精率で交雑がみられたが、*A. microphthalmia* および *A. aculeus* とともに 1 群体のみの実験であったため、今後の検証が必要であろう。また、当時の実験では *A. gemmifera*、*A. humilis* も *A. florida* とわずか(6%未満)に交雑することを示したが、これらの種は最近、再実験したところ、群体によっては、数十%以上のより高い受精率で交雑することが確認できたため、現在研究中である。全体的にみて、群体の形状が著しく異なる組み合わせ(コリンボース状(散房花状)の *A. nasuta* と樹枝状の *A. muricata*、洗瓶ブラシ状様の *A. florida*

と樹枝状の *A. intermedia*)はまさに種間交雑の典型ともいえるものであり、この時の結果が、2013年と2016年に発表した *A. florida*と *A. intermedia* の F1 雑種の研究 (Isomura et al. 2013, 2016)へとつながっている。

1995～1999年当時はミドリイシ属の種も豊富であり、様々な種を用いた交配実験をこの後もいつでも可能であろうと考えていたが、現在、阿嘉島でのサンゴ相を見る限り、当時実験に用いた種の内、5割程度が消失している。運よく、*A. florida*と *A. intermedia* は生き残っていたため、近年の雑種実験に用いることができたが、目の前にいるサンゴがいつなくなるかわからないというのが現在の状況であろう。このことを踏まえて、今できる研究は可能な限り進めていくべきだろう。

●謝辞

阿嘉島臨海研究所の岩尾研二研究員にはこれまでの20年間、研究に協力いただき心より感謝いたします。また、博士課程の研究では、大森 信名誉教授(東京海洋大学)、服田昌之教授(お茶の水大学)、阿嘉島臨海研究所の保坂三郎理事長、歴代の阿嘉島臨海研究所の研究員の方々に非常にお世話になりました。ここに深く感謝いたします。

●引用文献

深見裕伸 (2000) ミドリイシ科サンゴの生殖および遺伝学的進化の研究. 博士論文. 東京水産大学. 160pp

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.

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.

Hayashibara T, Shimoike K, Kimura T, Hosaka S, Heyward A, Harrison P, Kudo K, Omori M (1993) Patterns of coral spawning at Akajima Island, Okinawa, Japan. *Marine Ecology Progress Series* 101: 253-262

Isomura N, Iwao K, Fukami H (2013a) Possible natural hybridization of two morphologically distinct species of *Acropora* (Cnidaria, Scleractinia) in the Pacific: Fertilization and larval survival rates. *PLoS ONE* 8(2): e56701

Isomura N, Iwao K, Morita M, Fukami H (2016) Spawning and fertility of F1 hybrids of the coral genus *Acropora* in the Indo-Pacific. *Coral Reefs* 35: 851-855. doi:10.1007/s00338-016-1461-9

西平守孝, Veron JEN (1995) 日本の造礁サンゴ類. 海游舎, 東京. 439pp

Veron JEN (1995) Corals in space and time. University of New South Wales Press, Sydney, Australia. 321pp

Wallace C (1999) Staghorn corals of the world: a revision of the genus *Acropora*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 422pp

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