

放卵放精型のサンゴにおける受精(2) —ミドリイシ属サンゴを中心に—

北之坊誠也
琉球大学熱帯生物圏研究
センター瀬底研究施設

磯村 尚子
沖縄工業高等専門学校
生物資源工学科

深見 裕伸
宮崎大学農学部
海洋生物環境学科

守田 昌哉*
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. II

S. Kitanobo·N. Isomura·H. Fukami·M. Morita*
*E-mail: morita@lab.u-ryukyu.ac.jp

●はじめに

種の維持(≡生殖隔離に依存した種の維持)には様々な要因が関与する。同所的に生息し複数種の同調した産卵が見られるミドリイシ属サンゴでは、産卵後に海中での配偶子選択が生殖隔離に直結すると言っても過言でない。一方で、このような同調産卵をする種間でもその1/3で配偶子が異種間受精すると報告されており、現存する種が野外で交雑している可能性も考えられる。今回我々は、配偶子の受精選択を検討し、交雑の起こりえる状態および交雑能を保持している理由を議論したい。また、この受精から見たミドリイシ属サンゴの生殖戦略にも触れる。

●産卵時刻と種分化

ミドリイシ属サンゴはイシサンゴ類の中でも種数が多く、形態的にも多様である。この属は、放卵放精型の生殖様式をもち、満月付近に複数種が同調して産卵することが知られている(Reviewed in Baird et al. 2009)。なお、ミドリイシ属は雌雄同体性であり、1つのポリプから複数の卵と精子とがパックされた配偶子バンドルが放出されるが、この配偶子バンドルの放出をここでは便宜上産卵と呼ぶことにする。本属は複数種が同調

して産卵することから、産卵後海中には多様な種から放出された配偶子が混在している事になるが、種が保たれていることから何らかのメカニズムにより同種間での受精が起こり、生殖隔離が成立していると推察される。一方で、ミドリイシ属は、インド-太平洋では多様な種が報告されており(約150種)(Wallace 1999)、また、複数種に形態が似ている中間形態も報告されており(Hatta and Matsushima 2008; Richards et al. 2013; Wolstenholme 2004)、雑種種分化の可能性が提唱されている(Veron 1995)。従って、産卵から受精に至る過程は、ミドリイシ属の生殖隔離および種分化に深く関係している可能性がある。

産卵から受精までに深く関係するのが、1)卵と精子の放出時刻(産卵時刻)、2)精子濃度、そして3)受精の種特異性である。産卵時刻が重要である理由は、放卵放精型の海産無脊椎動物では、放卵放精後に精子は海中で時間とともに希釈され、受精成功に必要な精子濃度が維持されにくいからである(e.g., Levitan and Ferrell 2006; Yund 2000)。ミドリイシ属サンゴでも同様に、受精に際して適切な濃度の精子が必要となる(Nozawa et al. 2015; Willis et al. 1997)が、野外調査の結果では、産卵後、放出された卵と

精子は時間とともに拡散し、最適な精子濃度が維持されるのは産卵後2時間程度であるとされる(Omori et al. 2001)。そのため、産卵時刻は放卵放精型のミドリイシ属サンゴの受精成功において重要なのである。

●配偶子の種認識

同種との受精を選択する配偶子認識(受精の種特異性)は、同調するミドリイシ属サンゴで種の維持に関係する。多くのミドリイシ属サンゴで受精の種特異性が報告されている(Hatta et al. 1999; Willis et al. 1997; Wolstenholme 2004)。一方で、同調産卵の結果、異種の配偶子も海中に混在するため、交雑の危険性が高まる。実際、同調して産卵する種間の1/3の配偶子は異種間で受精が見られることが報告されている(e.g., Baird et al. 2009; Fukami et al. 2003; Willis et al. 1997; Willis et al. 2006)。実際、カリブ海において同時刻に産卵し異種間での受精が見られるミドリイシ属サンゴ(*Acropora cervicornis*と*A. palmata*)では、野外に交雑体が生息している(Fogarty et al. 2012; Vollmer and Palumbi 2002)。しかし、多様な種が生息するインドー太平洋では、異種間で受精が見られる種間での中間形態について野外からの報告があること(Hatta and Matsushima 2008)と遺伝子の分子生物学的研究から交雑体がおこることが示唆されている(van Oppen et al. 2002)のみである。配偶子の種認識が受精の種特異性に関与することは妥当であるが、これまで行なわれてきた研究が1つの種の組み合わせ(例 A 種 卵 × B 種 精子)だけで検討が行われてきたため、同調して産卵が起こるミドリイシ属サンゴの交雑の可否との関係性を結論づけるには不十分であった。本当の意味で配偶子認識と交雑の関係性を論じるためには、実際の産卵状況に即した検証が必要となる。

配偶子認識と交雑の可否を検証するために必要と

なるのは、複数種の卵と精子が混在した状態で、どちらの種と受精するか検討することである。すなわち、同時刻に産卵した際に、たとえ配偶子が異種間との受精能を持っていても、混在している同種の配偶子との受精を選択すると考えられるため、それを検証することが必要である。例えば、インドー太平洋に生息している同日のほぼ同時刻に産卵し交雑のみられる種間(*A. aspera* group)では、配偶子は同種由来の配偶子間で受精が起きることが報告されている(Willis et al. 2006)。一方で、先に述べたカリブ海のミドリイシ属サンゴでは、同種と異種の2種の精子が混在していても異種間で受精が起きる組み合わせがあり(Fogarty et al. 2012)、異種間で受精が起きる組み合わせと遺伝子浸透の方向性が一致している(Palumbi et al. 2012)。遺伝子浸透については、その他の種においても報告されている(Ladner and Palumbi 2012)。このように遺伝子的な観点からみると、野外でも交雑は起こりえるようである。しかしながら、カリブ海の交雑体がF1群体しか見つかっておらず、それらは無性生殖的に増殖すると考えられている(Vollmer and Palumbi 2002)。しかしこの時、無性生殖を選択するメカニズムが維持されているかは不明である。なぜなら、遺伝的な多様性を獲得出来ない無性生殖的に増殖することが生態学上適応的か曖昧だからである。従って、この交雑体の形成機構が維持されているのには何らかの理由があると思われるが現時点では不明である。

●網状進化

ミドリイシ属サンゴでは、交雑体の形成と関連、現在も種の分化と融合が繰り返されているという網状進化仮説が示唆されている(Veron 1995)。先に述べた中間形態はその例とされている。インドー太平洋からは似た形態をもつ種は報告されているが、その交雑の可否は種によって様々である。例えば、*Acropora hummilis*

group (*A. gemmifera*, *A. monticulosa*, *A. hummilis*) では異種間で受精が見られず、中間形態を示す群体では僅かながら異種間で受精が見られる (Wolstenholme 2004)。それに対して、形態も産卵時刻も一致することの多い *A. tenuis* と *A. donei* では異種間受精も見られ (Fukami et al. 2003)、中間形態も報告されている (Hatta and Matsushima 2008)。

この網状進化の仮説は、その交雑体が稔性を持ち活発に配偶子形成を行なう場合には現実味を帯びる。しかしながら、先述のとおりカリブ海に生息する交雑体 (*A. cervicornis* と *A. palmata* の交雑体) は F1 世代しか発見されていないこと (Vollmer and Palumbi 2002) から配偶子形成に疑問がもたれている。また、交雑体が活発に配偶子形成を行なっても交雑体の集団が大きくなければ有性生殖を行なうことは難しい。なぜなら、集団が小さければ、受精相手となる他群体由来の配偶子が少なくなるためである。従って、網状進化を検証するまえに、交雑体の成熟状況および生殖状況を明らかにする必要がある。

● 雑種分化の検証

放卵放精型のミドリイシ属サンゴにおいて、雑種分化と生殖の関連を検討する上で以下の点は必要不可欠である; 1) 雑種 F1 世代の形成の有無 (雑種 F1 世代が形成されるか)、2) 雑種 F1 世代の配偶子形成能の有無、そして 3) 雑種 F1 世代の配偶子認識 (受精の種特異性、他家受精はありえるのか、戻し交雑は起こすか) (図 1)。これらの問題を検討する上で、サボテンミド

リイシ (*Acropora florida*) およびトゲスギミドリイシ (*A. intermedia*) は有用な種である。この 2 種は配偶子が高い割合で異種間受精する (Hatta et al. 1999; Isomura et al. 2013)。さらに、交雑体を出し、配偶

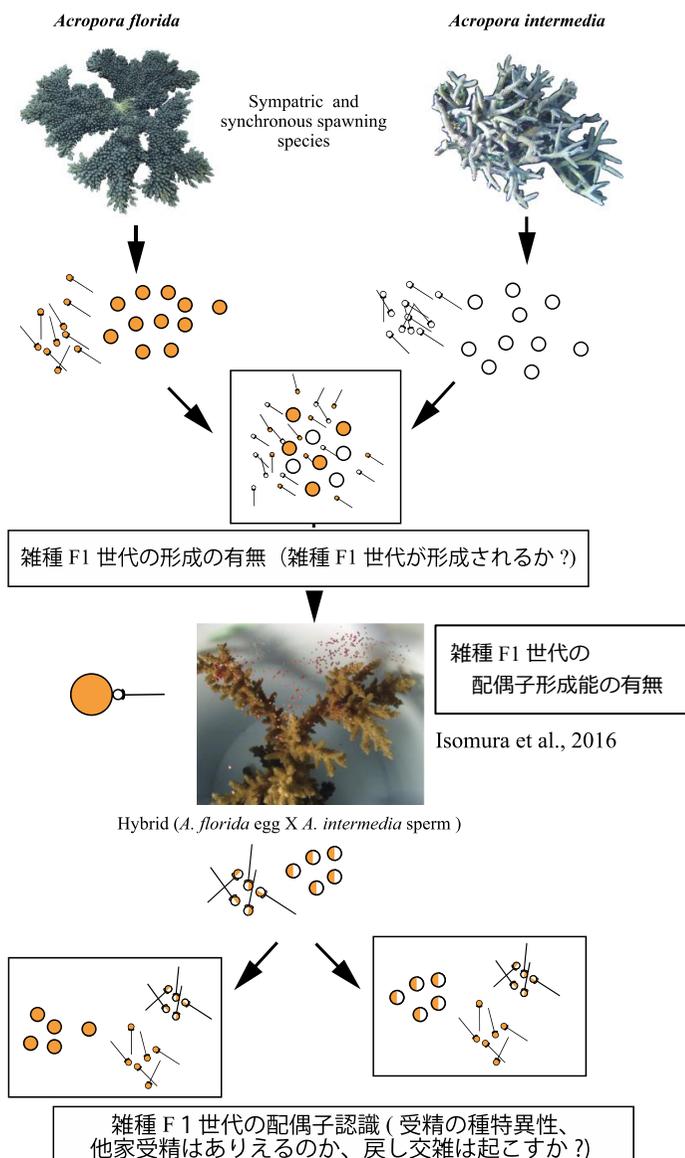


図 1 雑種分化の検証プロセス

雑種分化の検証には、配偶子の受精選択からのサボテンミドリイシ (*Acropora florida*) およびトゲスギミドリイシ (*A. intermedia*) の交雑の可能性の検討と、交雑体の受精能からみた F2 世代形成の可能性の検討が必要である。

表 1 阿嘉島でのサボテンミドリイシ(*Acropora florida*)とトゲスギミドリイシ(*A. intermedia*)の産卵時刻(2015年)

Species	<i>A. florida</i>	<i>A. intermedia</i>
Date &	3rd June 2015	3rd June 2015
Spawning time	21:30 (2 colonies) 21:38 (1 colony) 21:39 (2 colonies) 22:12 (2 colonies)	21:51 (1 colony) 22:01 (1 colony) 22:09 (2 colonies)

intermedia を材料に以下の実験を行ない検討した; 1)産卵時刻の検討(F1交雑体が形成するために、両種の配偶子が混在するか)、2)異種間受精を行なう条件の検討(同種由来配偶子が存在しても異種由来精子と受精するか?)、そして3)交雑体の配偶子は戻し交雑をするか(F2世代は形成される

子形成能を調べたところ、*A. florida* 卵と *A. intermedia* 精子由来の交雑体(F1)が活発に配偶子形成をすることが判明した(図1: Isomura et al. 2016)。従って、この2種の交雑体を用いることで、雑種分化に関する検証を行なうことが出来る。

配偶子認識と雑種分化の関係性を明らかにするために、我々は阿嘉島に生息する *A. florida* および *A.*

か)である。

産卵時刻に関して、2015年、阿嘉島に生息するサボテンミドリイシ(*A. florida*)およびトゲスギミドリイシ(*A. intermedia*)の産卵時刻は、*A. florida*の産卵が21:30から21:40分頃に開始し、その後 *A. intermedia* が21:50位から産卵を開始した。産卵開始時刻におよそ10~40分の違いがあった。一方で、配偶子バンド

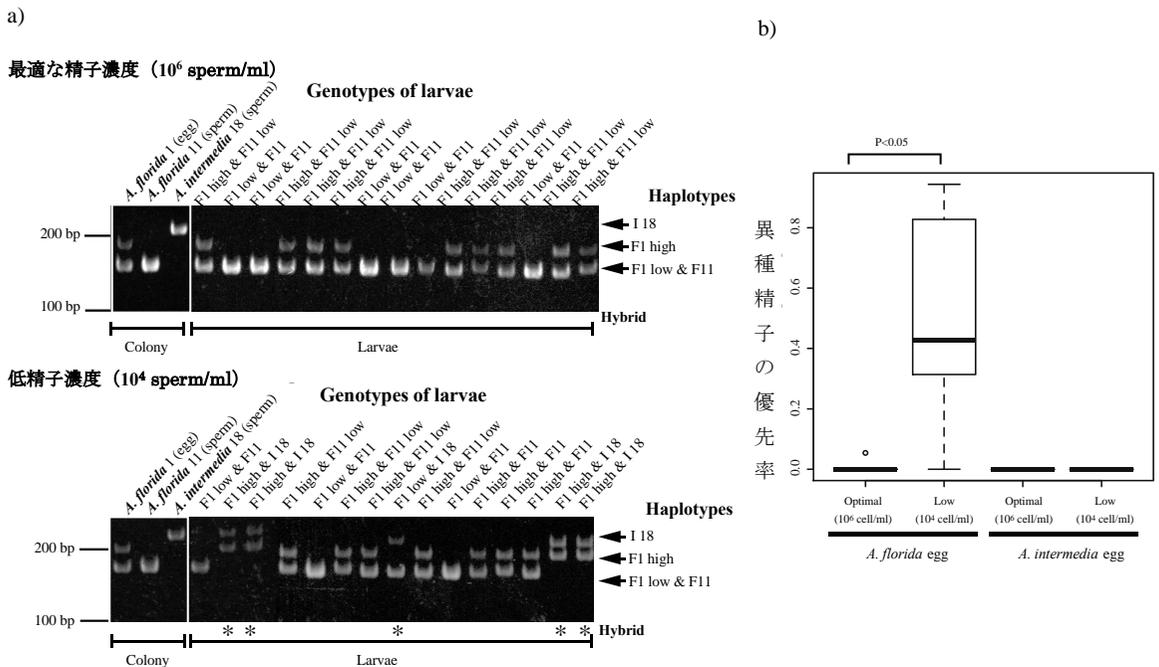


図 2 精子濃度に依存した異種間受精

サボテンミドリイシ(*Acropora florida*)およびトゲスギミドリイシ(*A. intermedia*)の精子選択実験による異種間受精の検討を行った。最適な精子濃度(10⁶ sperm/ml)と低精子濃度(10⁴ sperm/ml)の条件におけるマイクロサテライトマーカーによる遺伝子型の検討(a: *は異種間受精した胚を示す)からみた異種間受精選択率(b)。

ルが弾けて精子と卵に解離するのは、産卵直後ではないため、この 2 種の配偶子は混在しうると予想できる。ただし、年によっては、産卵日が一致しないこともあった (2016 年) (表 1)。

この 2 種の配偶子が交雑する可能性があるか、それぞれの種の卵が 2 種 (*A. florida* と *A. intermedia*) の精子のどちらと受精するか検討した。検討する条件として、最適な精子濃度 (10^6 sperm/ml) とその 1/100 の低精子濃度 (10^4 sperm/ml) で行なった。その結果、2 種の卵は、最適な精子濃度では、殆どの卵が同種の精子と受精した (図 2)。一方で、低精子濃度では、*A. florida* の卵は *A. intermedia* の精子と受精する卵の割合が上昇したが、*A. intermedia* の卵は同種の精子とのみ受精した (図 2: Kitanobo et al. 2016)。これは、先に産卵が開始する *A. florida* の卵は、低精子濃度の条件によっては *A. intermedia* の精子と受精しうることを意味している。従って、低精子濃度の条件下 (≒放出配偶子量が少ない環境下) では、F1 交雑体が形成される可能性がある。

F1 交雑体の生殖はどのように起きるのであろうか。カリブ海の交雑体では、断片を介した無性生殖的な増殖に依存していると考えられている (Vollmer and Palumbi 2002)。それに対して、*A. florida* の卵と *A. intermedia* の精子を交配させて育成した交雑体は、活発に配偶子形成を行なう (Isomura et al. 2016)。従って、配偶子を介した有性生殖が起こると考えられるが、他家受精に必要な交雑体の他群体由来の配偶子があるとは考えにくい。一方で、この交雑体由来の配偶子は他のミドリイシ属サンゴと異なり、自家受精する可能性が示されている。そこで我々は、様々な条件で自家受精の可能性を予備的に検討した。

はじめに、交雑体由来の卵と精子を混合しただけの胚、そして、交雑体の卵と親種 (*A. florida*) の精子を混合して得られた胚の父性判定を行ない、卵の自家

受精及び親種との戻し交雑の可否を検討した。その結果、自家受精した卵は、当然、同群体由来の精子と受精し、戻し交雑を行なった組み合わせでも、殆どの卵が自家受精していた。これは、バンドル放出後に瞬く間に自家受精を行なったためかもしれない。この結果は、交雑体の卵は他家受精および戻し交雑はせず、自家受精を選択することを示している。これは、生息数の少ない交雑体の卵が着実に受精をするために、自家受精を選択するとも言えるが、一方で、自家受精に使われなかった余剰の精子はどうなるのか、という疑問がある。

そこで、交雑体の精子が、親種 (*A. florida*) の卵と受精しうるか検討した。この際、交雑体の精子と親種 (*A. florida*) の精子と混合させた状態で検討した。その結果、例え交雑体の精子濃度が親種の精子よりも低くても、親種の卵は交雑体の精子と受精した。一方で、卵によっては、親種の精子とのみ受精した。この結果は、まだまだ検討する必要があるが、交雑体の精子が親種の卵と受精することは有り得そうである。以上の結果から考えると、交雑体の配偶子は、卵は自家受精による増殖、精子は自家受精と戻し交雑をしそうである。一方で、まだ *A. intermedia* との戻し交雑は調べることが出来ていない。今後、こちらも調べていく必要がある。

これらの結果は、予備的な結果であり更なる考察が必要であることを前置きするが、条件によってミドリイシ属では交雑が起こりえることと交雑体が活発に生殖することを示している。また、低精子濃度下で交雑する可能性があるということは、精子濃度が低い条件が続く場合、2 種間で遺伝子浸透が進んでいくことも意味する。ただし、たとえば筆者らの所属している琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設前では、1998年の大規模白化によりミドリイシ属の生息は減少したが、20年後の現在、生息数は増加している。つまり、

実際の個体群密度(精子濃度に関わる)は変動しており、従って、交雑は常に起きている訳ではなく、危機的な状況で選択されるのかもしれない。

●おわりに

配偶子認識は生殖隔離に非常に重要で、種を維持するために強化された(reinforcement)と考えられる。実際、先に述べたように、多くの種で受精の種特異性が高いことが報告されている。一方で、今回扱った2種では配偶子が交雑能を持ち、その交雑の可否は精子濃度に依存していそうである。このような一見曖昧な配偶子認識は、受精環境に適応した結果であると言えるかもしれない。さらに、交雑は結果的に、先に述べた中間形態群体の形成や網状進化に関係するのかもしれない。実際、ミドリイシ属の系統樹を核の遺伝子座を利用して作成しても、種によって明確なクレードを形成することは殆どない。中立な遺伝子座を選び、連結したデータによって作成すると良いのかもしれないが、交雑をして遺伝子浸透が進んでいる場合、明確な系統樹を作成することは難しいのかもしれない。今後は、生殖と系統解析の複合的な解析から更なる理解が進むことが期待される。

●引用文献

- 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
- 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: 1607-13
- Hatta M, Matsushima K. (2008) Presumed natural hybrids between *Acropora donei* and *Acropora tenuis*. *Galaxea* 10: 91-92
- 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
- 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
- Kitanobo S, Isomura N, Fukami H, Iwao K, Morita M (2016) The reef-building coral *Acropora* conditionally hybridize under sperm limitation. *Biology Letters* 12: DOI: 10.1098/rsbl.2016.0511
- Ladner JT, Palumbi SR (2012) Extensive sympatry, cryptic diversity and introgression throughout the geographic distribution of two coral species complexes. *Molecular Ecology* 21: 2224-38
- Levitan DR, Ferrell DL (2006) Selection on gamete recognition proteins depends on sex, density, and genotype frequency. *Science* 312: 267-9
- Nozawa Y, Isomura N, Fukami H (2015) Influence of sperm dilution and gamete contact time on the fertilization rate of scleractinian corals. *Coral Reefs* 34: 1199-1206
- Omori M, Fukami H, Kobinata H, Hatta M (2001) Significant drop of fertilization of *Acropora*

-
- corals in 1999: An after-effect of heavy coral bleaching? *Limnology and Oceanography* 46: 704-706
- 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
- Richards ZT, Miller DJ, Wallace CC (2013) Molecular phylogenetics of geographically restricted *Acropora* species: implications for threatened species conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 837-51
- 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: 1363-76
- Veron JEN (1995) Corals in space and time. University of New South Wales Press, Sydney, Australia. 321pp
- Vollmer SV, Palumbi SR (2002) Hybridization and the evolution of reef coral diversity. *Science* 296: 2023-5
- Wallace CC (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
- Willis BL, 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
- Yund PO (2000) How severe is sperm limitation in natural populations of marine free-spawners? *Trends in Ecology & Evolution* 15: 10-13