

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07414

研究課題名(和文) 同調性産卵を行なう放卵放精型のミドリイシ属サンゴにおける配偶子種認識の解明

研究課題名(英文) Investigation of gamete recognition in the synchronous spawning coral *Acropora*

研究代表者

守田 昌哉 (Morita, Masaya)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：80535302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：サンゴ礁を形成する主たるサンゴであるミドリイシ属の生殖隔離に深く関与する受精の種選択性を生理生態学的な側面から調べた。その結果、ミドリイシ属サンゴの配偶子のもつ種認識から、1) 種を維持するためのメカニズムと密接に関係し、かつ2) 種分化にも深く関与した、ことが判明した。中でも、交雑能を持つウスエダミドリイシとドーンミドリイシは、野外ではほとんど受精しないことを卵の受精選択性から明らかにし、集団構造からも明らかにした。これは、ミドリイシ属サンゴの多様な種の維持や多様な種へ進化したことと、生命の始まりである受精時の配偶子認識が深く関与することを明らかにしたと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

沖縄沿岸海域に分布するサンゴ礁の主たる構成者はミドリイシ属サンゴである。このサンゴ礁は様々な生物の棲家となるが、そのサンゴ礁はミドリイシ属サンゴの産卵時における受精が命の始まりになり、その後の維持に繋がる。したがって、本研究で明らかにしたミドリイシ属サンゴの同種で選択的に起こる受精選択のメカニズム(配偶子種認識)はサンゴ礁の維持に直結する重要な研究課題である。学術的にも、刺胞動物門に属するミドリイシ属サンゴの配偶子種認識を明らかにすることは、他の生物群にも同様に存在する配偶子種認識の祖先形質の理解にもつながり、さらには種を維持(生殖隔離)するメカニズムの理解に繋がることになる。

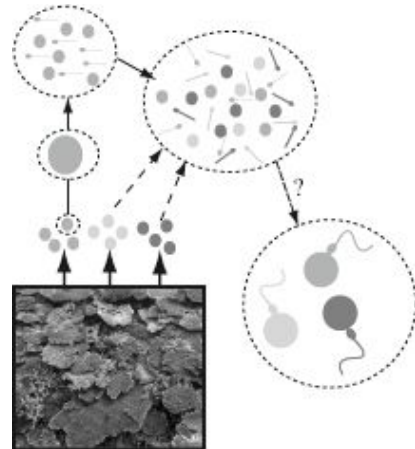
研究成果の概要(英文)：The reef-building coral *Acropora* is species-rich and highly diversified in their morphology; species identification is often difficult because of its ambiguity. These features of the *Acropora* is supposed to be caused by hybridization and whole genome analyses support their hybridization. However, most of the species shows species-specific fertilization and their gamete species recognition is strict to accept the heterospecific gametes for fertilization. In this study, I investigated the relationship between reproductive isolation and gamete species recognition with the intercrossing species *Acropora tenuis* and *Acropora donei*. Those species could hybridize in vitro, but their gametes prefer to fertilize with conspecific gametes in the mix state of gametes from 2 species. Moreover, their population structure is distinctive and thus hybridization seems rarely occur within these species. Therefore, their gamete species recognition is enough for their reproductive isolation.

研究分野：生殖生物学

キーワード：ミドリイシ属サンゴ 配偶子種認識 受精 生殖隔離 交雑

1. 研究開始当初の背景

ドリイシ属サンゴは、沖縄沿岸海域においてサンゴ礁を形成する属であり、種数が非常に多く、同所的に生息している(右図)。ミドリイシ属は、1つの群体内で卵と精子を作る同時の雌雄同体生物である。産卵は卵と精子の複合体であるバンドルを形成し、このバンドルを海中に放出する。興味深いことに、先に述べたように種数が多いにも関わらず、多くの種が同日のほぼ同時刻に産卵する。従って、産卵後、海中には多くの種から放出された卵と精子が混在していると考えられる(図1)。このようなサンゴの複数種の同調した産卵は、異種間での交雑のリスクが高まると推察されるが、多くの種は保たれている(生殖隔離が保たれている)。これ



は、多くの種では受精の種特異性は高い= 厳密な配偶子種認識があるためであろう(Baird et al., 2009; Willis et al., 2006 など)。一方で、同調して産卵する約1/3のミドリイシ属サンゴが異種間で受精(5~60%の受精率)するため(Willis et al., 2006)、同調した産卵をするにも関わらず厳密な配偶子種認識を持つ種と持たない種がいる理由は不明である。このような受精の種特異性を司るメカニズムは、どのようにして形成されてきたのであろうか?このような機能を司るタンパク質の同定や交雑する種の配偶子認識を調べることは、多様な種へ分化し、その後生殖隔離が維持される機構を理解する上で非常に重要な知見となる。

2. 研究の目的

ミドリイシ属サンゴの受精の種特異性を司るメカニズムを理解するために、本研究課題では、ミドリイシ属サンゴの配偶子種認識に関して、生理生化学的手法、野外活動による生息調査、そして交雑の有無を検出するために集団遺伝学的に以下のような解析を行った。

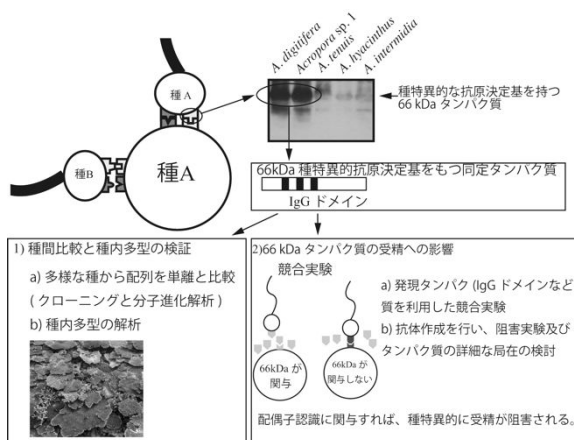
- 1) 同定した種特異的な抗原決定基を持つタンパク質の機能解析をすることを目的とする。
発現タンパク質を用いた競合実験や、抗体による受精阻害実験により同定したタンパク質が種認識に関与するか判明すると期待できる。
- 2) 曖昧な種認識を持つミドリイシ属サンゴが実際に野外で交雑しているのかを明らかにすることを第2の目的とする。配偶子が異種間受精するウスエダミドリイシ(*Acropora tenuis*)とドンミドリイシ(*Acropora donei*)の産卵時刻、野外に近い条件での受精選択、そして実際に交雑をしているのかを集団遺伝学的に解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

上記の目的に合わせて以下のように実験を行った。

1) 同定した種特異的な抗原決定基を持つタンパク質の機能解析

これまでにコクビミドリイシ (*Acropora digitifera*) を材料に種特異的な抗原決定基を持つ 66kDa タンパク質を同定していた。その機能解析をするために、66kDa タンパク質に存在する接着に関与すると推察される IgG ドメインをメインに機能解析を行った。機能解析のために、この IgG ドメインの発現タンパク質を



用いた競合実験および抗体による受精阻害実験を行った。また、このタンパク質の配列を比較するために相同検索などを行いオルソログの検出をおこなった。

2) 曖昧な種認識を持つミドリイシ属サンゴが実際に野外で交雑しうるのはか

産卵時刻が近く異種間で高い受精率を示すウスエダミドリイシ (*A. tenuis*) とドーンミドリイシ (*A. donei*) を材料に、a) 精子選択実験による受精の選択性、b) 産卵の確認、そして c) 野外で交雑しているか集団遺伝学的な解析を、マイクロサテライトマーカーを利用しておこなった。

4. 研究成果

1) 同定した種特異的な抗原決定基を持つタンパク質の機能解析

IgG ドメインが受精に関与するか発現タンパク質を用いた競合実験により検討した。その結果、同定した種のコクビミドリイシ (*A. digitifera*) および同じ抗原決定基を持つコクビミドリイシの隠蔽種 *Acropora* sp.1 以外では受精阻害は起きなかった。また、66kDa タンパク質を認識する抗体を用いた実験でも同様にコクビミドリイシと隠蔽種の sp.1 でのみ特異的に受精阻害が観察できた。以上の結果は、この 66kDa タンパク質の IgG ドメインが種特異的な受精に関与していると推察できた。

この 66kDa タンパク質の相同遺伝子を Reef Genome のサイトで同属のミドリイシで検索すると相同性の高い配列が検出できた。また現在 RNAseq を数種のミドリイシ属で行い、相同遺伝子の探索を行っている。探索が終了後、IgG ドメインが適応進化をしているか非同義 / 同義置換率を指標に PAML 内の Codeml で検定する予定である。

2) 曖昧な種認識を持つミドリイシ属サンゴが実際に野外で交雑しうるのはか

他のミドリイシ属サンゴよりも早く産卵するウスエダミドリイシ (*A. tenuis*) とドーンミドリイシ (*A. donei*) を対象に沖縄本島最北部奥、瀬底島、慶良間諸島の一部である阿嘉島の 3 地点で調査研究 (産卵調査、分布調査、精子選択実験、そして集団遺伝学的な解析) をおこなった。

a. 産卵調査

調査を行った 2017 年は阿嘉島と奥の 2 地点では 2 種共に産卵が確認できたが、瀬底島のドーンミドリイシは産卵を確認できなかった。産卵の見られなかったドーンミドリイシで組織切片を作成し確認したが、配偶子形成が見られなかった。

b. 分布調査

3 地点で各種の生息群体密度を測定したところ、瀬底島のドーンミドリイシの生息密度はウスエダミドリイシに対して少なく、囲まれるように生息していると推察された。

c. 精子選択実験

同時に産卵したウスエダミドリイシとドーンミドリイシの精子を混合し、卵がどちらの精子と受精するか検討した。その結果、2 種共に同種と選択的に受精するようであった。一方でドーンミドリイシは組み合わせによっては同種と同等くらいに異種のウスエダの精子とも受精するようであった。これは、ほぼ同種の精子と選択的に受精し交雑は回避されていると推察できた。

d. 集団遺伝学的解析

3 地点で 2 種の手袋遺伝学的解析を行ったところ、奥、阿嘉島では 2 種は個別の集団構造を持っていた。一方で、瀬底島のドーンミドリイシは遺伝子浸透が進んでいるようであった。

以上の結果から、曖昧な配偶子種認識を持っている種間でもほぼ交雑は起きないと推察されるが、条件によっては野外でも浸透交雑が起きるのではないかと推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hironobu Fukami, Kenji Iwao, Naoki H Kumagai, Masaya Morita, Naoko Isomura	4. 巻 7
2. 論文標題 Maternal inheritance of F1 hybrid morphology and colony shape in the coral genus Acropora	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peer J	6. 最初と最後の頁 e6429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.6429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morita Masaya, Kitanobo Seiya, Nozu Ryo, Iwao Kenji, Fukami Hironobu, Isomura Naoko	4. 巻 38
2. 論文標題 Reproductive strategies in the intercrossing corals Acropora donei and A. tenuis to prevent hybridization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Coral Reefs	6. 最初と最後の頁 1211 ~ 1223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00338-019-01839-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Morita, M., Kitanobo, S.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springier	5. 総ページ数 10
3. 書名 Chapter 8 Reproduction in the Coral Acropora Yoshida, M. and Asturiano, Juan F. (Eds.) In book: Reproduction in Aquatic Animals	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----