

## 研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |                                                                  |        |         |               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------|--------|---------|---------------|
| 研究テーマ<br>(和文) AB                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         | ミドリイシ属サンゴにおける配偶子認識機構の解明                                          |        |         |               |
| 研究テーマ<br>(欧文) AZ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         | Investigation of gamete-recognition in the coral <i>Acropora</i> |        |         |               |
| 研究氏<br>代<br>表<br>名<br>者                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | カタカナ CC | 姓) モリタ                                                           | 名) マサヤ | 研究期間 B  | 2013 ~ 2014 年 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 漢字 CB   | 守田                                                               | 昌哉     | 報告年度 YR | 2014 年        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | ローマ字 CZ | MORITA                                                           | Masaya | 研究機関名   | 琉球大学          |
| 研究代表者 CD<br>所属機関・職名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         | 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 准教授                                   |        |         |               |
| <p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめて下さい。)</p> <p>ミドリイシ属サンゴは放卵放精型の産卵様式をもつ同時性雌雄同体生物である。またミドリイシ属は種数も多く同所的に生息している。さらに、これらのミドリイシ属サンゴの多くが月齢に同調して多くの種がほぼ同時刻に産卵することも知られている。従って、産卵後、海中には多くのサンゴ由来の配偶子が混在していると考えられるが、生殖隔離が保たれている。これは、海中で種特異的な受精が起きているためと考えられる。実際、ミドリイシ属サンゴの多くは受精が種特異的に起こる(<i>in vitro</i>)ことが知られている。言い換えると、同調して産卵する種間では交雑を回避する厳密な配偶子認識を持ち合わせていると言える。そこで、ミドリイシ属サンゴのコユビミドリイシ(<i>Acropora digitifera</i>)を用いて、配偶子認識のメカニズムの解明を、1) 配偶子認識タンパク質の探索、2) 産卵期の異なる近縁種間での交雑実験を介して行った。まず、配偶子認識タンパク質の探索を行うために、精子の界面活性剤可溶化成分に対するポリクローナル抗体の作成を行った。この抗体は、精子の頭部から尾部までに局在する多くのタンパク質と反応した。この抗体を交差しない種由来の精子と混合・吸収させ、種特異的な抗原決定基を持つタンパク質と反応する抗体を精製した。その結果、2つのタンパク質(66 kDa および 53kDa) が種特異的な抗原決定基を持つことが判明した。一方で、産卵期の異なるコユビミドリイシの隠蔽種(<i>Acropora</i> sp. 1)とは抗原決定基が一致することも判明した。もし、このタンパク質が種特異的な受精に関与するのであれば、この2グループ間で配偶子は交差すると考えられる。そこで、精子の凍結保存法を開発し、2) 産卵期の異なる近縁種間での交差性の検証をおこなった。コユビミドリイシおよび隠蔽種間で凍結保存精子を用いて交差実験を行った所、この二種間で高い受精率を示すことが判明した。さらに、隠蔽種の精子で抗体を吸収すると、66 kDa タンパク質の反応が見られないことから、このタンパク質の抗原決定基は二種間で同じ≡種認識に関わるタンパク質である可能性が高いことも判明した。今後はこの 66kDa タンパク質の同定及び機能解析を行っていく予定である。</p> |         |                                                                  |        |         |               |
| キーワード FA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | サンゴ     | 受精                                                               | 放卵放精   | 生殖隔離    |               |

(以下は記入しないで下さい。)

|            |  |  |  |  |           |  |  |  |  |  |  |  |  |
|------------|--|--|--|--|-----------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 助成財団コード TA |  |  |  |  | 研究課題番号 AA |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 研究機関番号 AC  |  |  |  |  | シート番号     |  |  |  |  |  |  |  |  |

| 発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入して下さい。） |                    |                                                                                                                                                                                                   |                   |             |   |   |   |                    |               |
|----------------------------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------|---|---|---|--------------------|---------------|
| 雑誌                               | 論文標題 <sup>GB</sup> | Cryopreservation of <i>Acropora digitifera</i> sperm with use of sucrose and methanol based solution                                                                                              |                   |             |   |   |   |                    |               |
|                                  | 著者名 <sup>GA</sup>  | Ohki, S. <b>Morita, M.</b> , 他 3 名                                                                                                                                                                | 雑誌名 <sup>GC</sup> | Cryobiology |   |   |   |                    |               |
|                                  | ページ <sup>GF</sup>  | 134 ~ 139                                                                                                                                                                                         | 発行年 <sup>GE</sup> | 2           | 0 | 1 | 4 | 巻号 <sup>GD</sup>   | 69            |
| 雑誌                               | 論文標題 <sup>GB</sup> | Changes in spawning time led to the speciation of the broadcast spawning corals <i>Acropora digitifera</i> and the cryptic species <i>Acropora</i> sp. 1 with similar gamete-recognition systems. |                   |             |   |   |   |                    |               |
|                                  | 著者名 <sup>GA</sup>  | Ohki, S. <b>Morita, M.</b> , 他 2 名                                                                                                                                                                | 雑誌名 <sup>GC</sup> | Coral reefs |   |   |   |                    |               |
|                                  | ページ <sup>GF</sup>  | 1~10                                                                                                                                                                                              | 発行年 <sup>GE</sup> | 2           | 0 | 1 | 5 | 巻号 <sup>GD</sup>   | On line first |
| 雑誌                               | 論文標題 <sup>GB</sup> |                                                                                                                                                                                                   |                   |             |   |   |   |                    |               |
|                                  | 著者名 <sup>GA</sup>  |                                                                                                                                                                                                   | 雑誌名 <sup>GC</sup> |             |   |   |   |                    |               |
|                                  | ページ <sup>GF</sup>  | ~                                                                                                                                                                                                 | 発行年 <sup>GE</sup> |             |   |   |   | 巻号 <sup>GD</sup>   |               |
| 図書                               | 著者名 <sup>HA</sup>  |                                                                                                                                                                                                   |                   |             |   |   |   |                    |               |
|                                  | 書名 <sup>HC</sup>   |                                                                                                                                                                                                   |                   |             |   |   |   |                    |               |
|                                  | 出版者 <sup>HB</sup>  |                                                                                                                                                                                                   | 発行年 <sup>HD</sup> |             |   |   |   | 総ページ <sup>HE</sup> |               |
| 図書                               | 著者名 <sup>HA</sup>  |                                                                                                                                                                                                   |                   |             |   |   |   |                    |               |
|                                  | 書名 <sup>HC</sup>   |                                                                                                                                                                                                   |                   |             |   |   |   |                    |               |
|                                  | 出版者 <sup>HB</sup>  |                                                                                                                                                                                                   | 発行年 <sup>HD</sup> |             |   |   |   | 総ページ <sup>HE</sup> |               |

#### 欧文概要 <sup>EZ</sup>

The broadcast spawner coral *Acropora* shows multi-species spawning. Therefore, gametes from many species are present in the water column after spawning. Although the presence of heterospecific gametes, fertilization may occur in between conspecific gametes. To investigate the mechanisms of the gamete recognition in the coral *Acropora*, we tried to identify sperm protein(s) that contributes species-specific fertilization. At first, we made polyclonal antibody against detergent soluble sperm fraction of the coral *Acropora digitifera* that contains proteins membrane proteins. The antibody recognized many sperm proteins that localized along sperm. To purify the IgG that recognize species-specific epitopes, absorption of the antibody with heterospecific sperm was done. After absorption, antibody showed two species-specific reacted bands were detected. Those two bands (66 and 53 kDa) were appeared species-specific manner except the cryptic species of *A. digitifera* called *Acropora* sp.1. *Acropora* sp.1 is closely related group of *A. digitifera* but they spawned in different month of the *A. digitifera*. If those proteins are involved in the gametes-species recognition, these 2 species group can cross. To examine the feasibility of crossing between these 2 species, we developed cryopreservation protocol for the coral, and crossing trials were carried out with cryopreserved sperm. The cryopreserved sperm of both *A. digitifera* and *Acropora* sp. 1 showed high crossing rates with heterospecifics, thus proteins that have species-specific epitopes may be related to gamete-species recognition. Identification of those proteins and functional assay will be carried out near future.