

## IV-8. 高温耐性型サンゴの種苗生産技術の開発

## 目 次

### IV-8. 高温耐性型サンゴの種苗生産技術の開発

1	はじめに	IV-8-1
2	DNA マーカー育種	IV-8-1
2.1	過年度の成果	IV-8-1
2.2	親群体の高水温暴露および DNA 解析	IV-8-4
	(1) 目的	IV-8-4
	(2) 方法	IV-8-4
	(3) 結果	IV-8-5
2.3	高水温耐性遺伝型の次世代への伝播の確認	IV-8-8
	(1) 目的	IV-8-8
	(2) 方法	IV-8-8
	(3) 結果	IV-8-8
2.4	高耐性および低耐性親サンゴ由来の配偶子を用いて生産した稚サンゴの高水温暴露実験	IV-8-10
2.5	沖ノ鳥島由来の稚サンゴにおける高水温暴露前後の遺伝型の変化	IV-8-12
2.6	実験および解析結果の検討	IV-8-13
3	従来法（選抜育種）による高水温耐性サンゴの育種	IV-8-14
	(1) 目的	IV-8-14
	(2) 方法	IV-8-14
	(3) 結果および考察	IV-8-15
4	引用文献	IV-8-15

## 1 はじめに

近年、サンゴ自体が遺伝的に高温耐性を持つ可能性があると考えられている。サンゴの遺伝子と高温耐性に関しては、Barshis et al. (2013), Dixon et al. (2015) 等により研究が行われており、高水温下で特定の遺伝子が発現することが報告されている。また、高水温にサンゴを暴露することによって選抜した高水温耐性を持つ親サンゴから生産した稚サンゴを、海域に移植することによりサンゴ群集の高水温に対する再生能力を高めようというアイデアも発案されている (Humanes, 2021)。さらに、人為的遺伝子組み換えにより高温耐性を持つサンゴを生産し移植しようとする試みもある (Mascarelli 2014, van Oppen et al. 2015)。

本調査では、2018年度より高水温耐性サンゴの種苗生産技術を確立することを目的として、①遺伝情報を利用した品種改良法 (DNA マーカー育種とも呼ばれる)、および②従来の育種法 (選抜育種) について技術開発を行っている。

## 2 DNA マーカー育種

### 2.1 過年度の成果

この技術は、高水温耐性を持つサンゴ群体を DNA マーカー\*1により特定し、これらの子孫を有性生殖により生産する方法である。本技術開発にあたり、まずは、高水温耐性に遺伝子が関与していることと、高水温耐性の遺伝的特徴が次世代に引き継がれることを確認する必要があることから、以下の3つの実験・研究を実施している (図-IV.8.1)。

- ・ 高水温での飼育による親サンゴの高耐性、中耐性、低耐性へのグループ分け
- ・ グループ分けされた高耐性および低耐性サンゴ間での DNA の比較および DNA マーカーの開発、ならびに DNA マーカーを用いて簡易的にサンゴの高水温耐性を判別する技術の開発 (図-IV.8.2)
- ・ 高・中・低耐性サンゴ由来の精子と卵を様々な組み合わせで交配して得られる稚サンゴ (ここでは、「組み合わせ交配サンゴ」と呼ぶ) を用いた高水温への暴露実験および高水温で生残したサンゴの遺伝的特徴の確認、ならびに高水温耐性の性質が次世代へ遺伝的に継承されるかどうかの確認

\*1: DNA マーカーとは、異なる性質を持つグループを識別するために、DNA 塩基配列の違いによってゲノム (DNA のすべての遺伝情報=ある種のすべての DNA 塩基配列) 上に設定した目印のこと。ゲノム上に並んだ DNA の塩基配列に違いがあり、その違いを識別できれば、DNA マーカーとして利用できる。

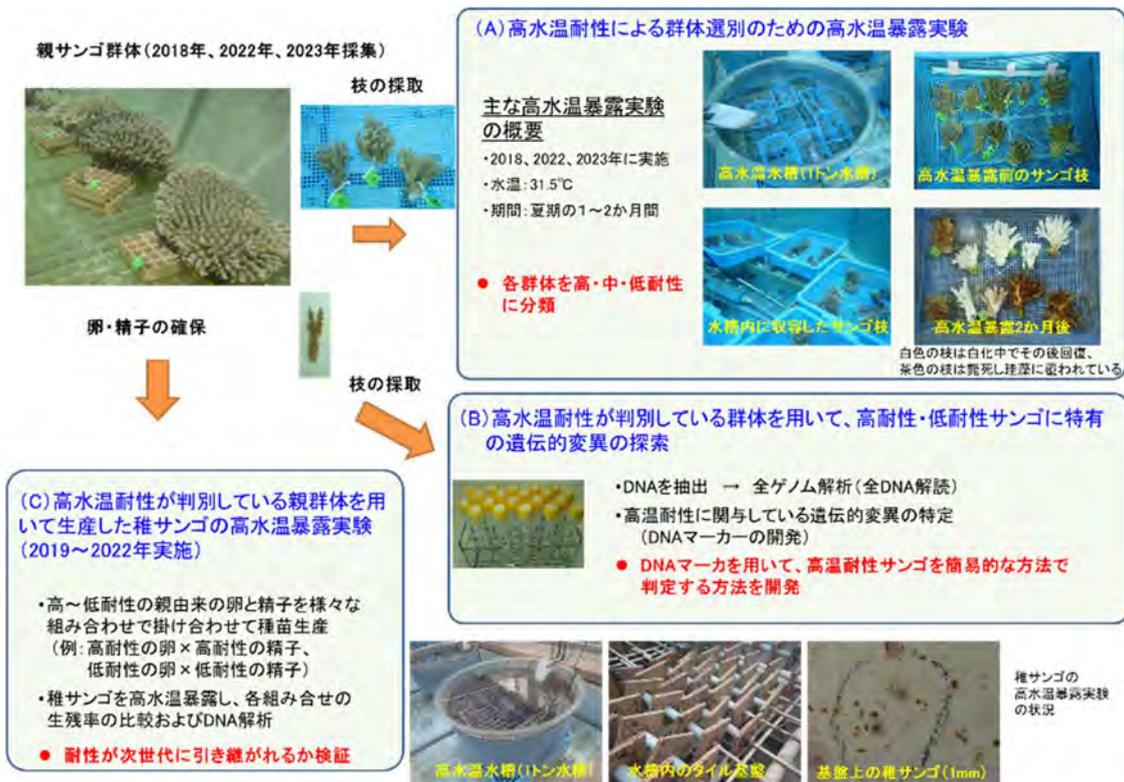


図-IV. 8. 1 DNA マーカー開発のための実験の流れ

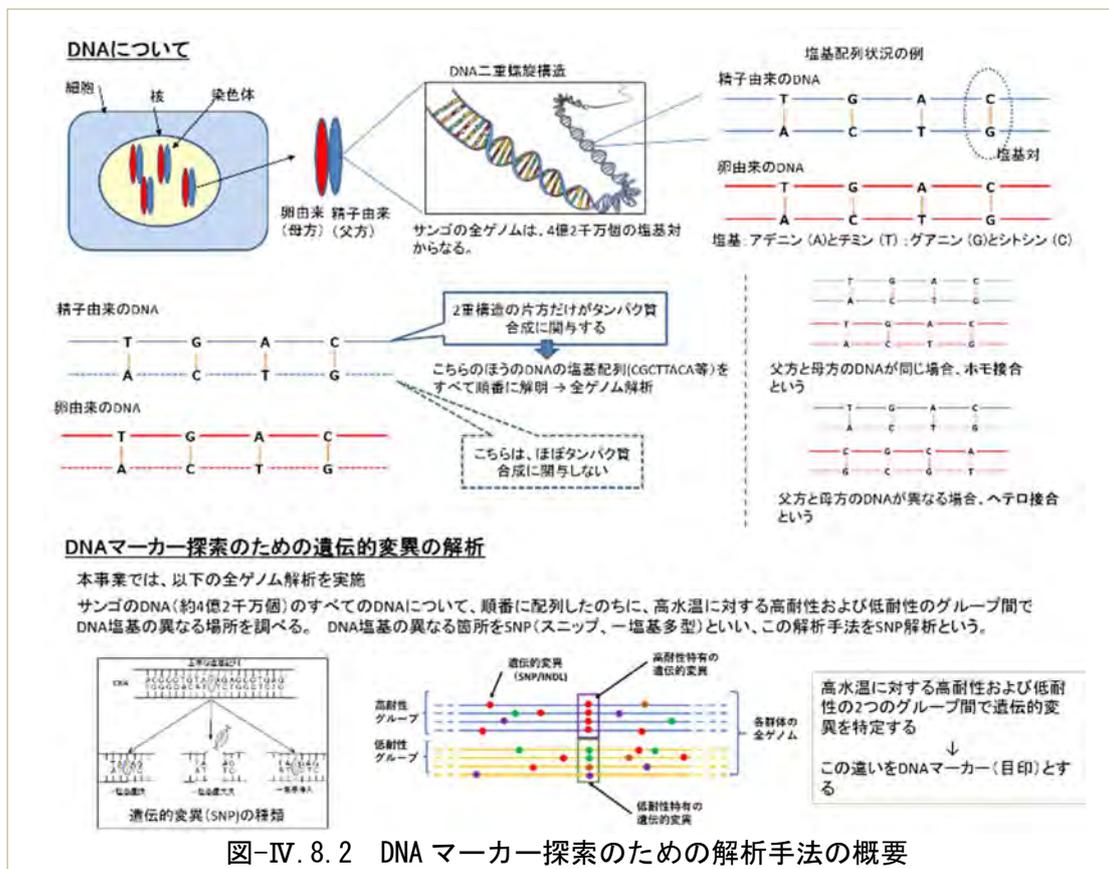


図-IV. 8. 2 DNA マーカー探索のための解析手法の概要

その結果、2020 年度までに、高耐性および低耐性グループ間において、遺伝的変異が存在する可能性が分かり、また、有力な DNA マーカーの候補が明らかとなった（表・IV.8.1）。

表-IV.8.1 DNA マーカー候補のゲノム上の位置と遺伝子型

参考配列番号	57	57	57	57
ゲノム上の位置	770768	770792	770834	770863
遺伝子型	T/T	T/T	A/A	T/T

- ・ゲノム上の位置が T, T, A, T のホモ接合であれば高耐性となる  
（ホモ接合：父由来と母由来の両方の DNA が同じ塩基配列であること）

その後、2021 年度には、この DNA マーカー領域を PCR\*2 により増幅するために PCR 用プライマー（下記）を開発するとともに、DNA マーカー部分の DNA の塩基配列を判読する技術も開発し、簡易的にサンゴの個々の群体の高水温耐性を判別するためことが可能となった。

【DNA マーカー周辺の DNA を増幅するためのプライマー】

Forward プライマー：scaffold57\_Fw: 5'- CAGATTCTCAAATATGTGTCGT -3'

Reverse プライマー：scaffold57\_Rv: 5'- TGTAAACTCCTAGCATCTCAGG -3'

※上記のプライマーは、4 箇所の DNA マーカーを含んだ近傍領域 373 ペアの DNA を増幅する。

\*2: PCR とは、Polymerase Chain Reaction（ポリメラーゼ連鎖反応）の頭文字を取った用語で、DNA の特定の領域を増幅するための手法。「DNA の熱による 2 重らせん構造（二本鎖）の分離」、「一本鎖 DNA へのプライマーの結合」、「DNA ポリメラーゼ（酵素）により、1 本鎖 DNA へ対応する DNA を順番に連結させて、もう片方の DNA 鎖を合成」という工程を 25～30 回繰り返し、目的の DNA 領域を数時間で 100 万倍に増幅することが可能。DNA の量を増やすことにより、機器（シーケンサー）により、DNA の塩基配列の判読が可能となる。

「組み合わせ交配サンゴ」を用いた実験については、これまで十分な成果が得られていない。水槽での高水温暴露において、表現型\*3 が高耐性の親由来の卵と精子を交配した稚サンゴが、他の組み合わせ交配の稚サンゴ（親群体の組み合わせが低耐性×低耐性、低耐性×中耐性、中耐性×中耐性）より高い生残率を示す傾向が見られていない。

また、遺伝型\*3 についても、高耐性の親群体由来の卵と精子を掛け合わせて生産した稚サンゴにおいても、低耐性の親由来の稚サンゴより生残率が高い傾向は明確には見られなかった。

この原因は現在のところ不明である。このため、本年度は、過去のデータを整理してまとめるとともに、以下の実験を新たに行い、どこに問題点があるのか検討を行った。

- ・新たに野外より採集した 50 群体のサンゴを用いた、高水温暴露による高水温耐性の判定とその遺伝的特徴の解析
- ・親サンゴおよびその群体より得られた配偶子の遺伝型の比較
- ・親と子の遺伝型の比較

\*3 表現型とは、遺伝子が発現する形質のことをいい、サンゴの高水温耐性の場合、高い水温で「生き残ること」もしくは「斃死すること」である。遺伝子型とは、形質の元になる遺伝子の組み合わせ（もしくは DNA 塩基配列の組み合わせ）のことであり、これまでの研究経過から、高水温耐性を持つ群体は「TTAT ホモ接合 T/T, T/T, A/A, T/T」、低耐性の群体は「TTAT ホモ接合以外」となると考えられる。

## 2.2 親群体の高水温暴露および DNA 解析

### (1) 目的

開発済みの DNA マーカー候補の有効性を調べることと、高水温暴露で生残したサンゴは遺伝的に高耐性であるという仮説を検証することを目的として、久米島海域において採集したウスエダミドリイシの枝片を水槽内にて高水温暴露するとともに、DNA 解析を実施した。

### (2) 方法

2023 年 6 月 15 日に、久米島周辺海域より 50 群体のウスエダミドリイシを採集した（図-IV.8.3）。採集海域は、久米島北東部沿岸（水深 10m）および南東部の島尻湾内（水深 2～6m）であった（図-IV.8.4、IV.8.5）。採集した群体数は、久米島の北東部沿岸（1 地点）および島尻湾内（3 地点）から、それぞれ 25 群体であった。各群体より折り取った 3 本の枝を、サンゴ増殖研究所の水槽内にて、7 月 4 日より約 1 か月間 31.5°C で高水温暴露し、高水温耐性の表現型を判定した（図-IV.8.6）。また、各群体の高水温耐性 DNA マーカー領域の DNA を開発済みのプライマーを用いて PCR 法で増幅した後、DNA マーカー領域の塩基配列を判読し遺伝型を判定した。



図-IV. 8.3 採集したウスエダミドリイシ（左：海域、右：採集後施設内）

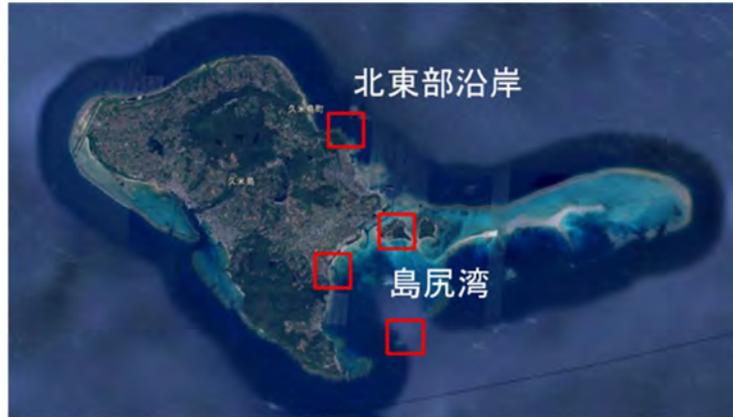


図-IV.8.4 サンゴの採集海域（赤枠の3地点より採集）



図-IV.8.5 サンゴの採集地点の状況（左：北東沿岸、右：島尻湾内）



図-IV.8.6 高水温暴露の状況  
（左：実験に用いた1トン・ポリカーボネイト水槽、右：水槽に収容したサンゴ枝片）

### (3) 結果

サンゴ枝片の高水温暴露実験の結果および状況を図-IV.8.7 およびIV.8.8 に示す。久米島北東部沿岸より採集した群体（群体番号 Q1～25）においては、比較的斃死の比率が高かった。この海域は、外洋に面しており高水温になりにくいいため、サンゴ自体が高水温に慣れて

いない可能性がある。一方、島尻湾より採集した群体（群体番号 Q26～50）においては、白化しない、あるいは白化しても常温海水に戻した後に回復した群体が大多数であった。この海域は湾内で閉鎖的であることから水温が高くなりやすい。厳しい環境下に置かれることにより、慣れによりサンゴの高水温耐性が高くなった可能性も考えられる。

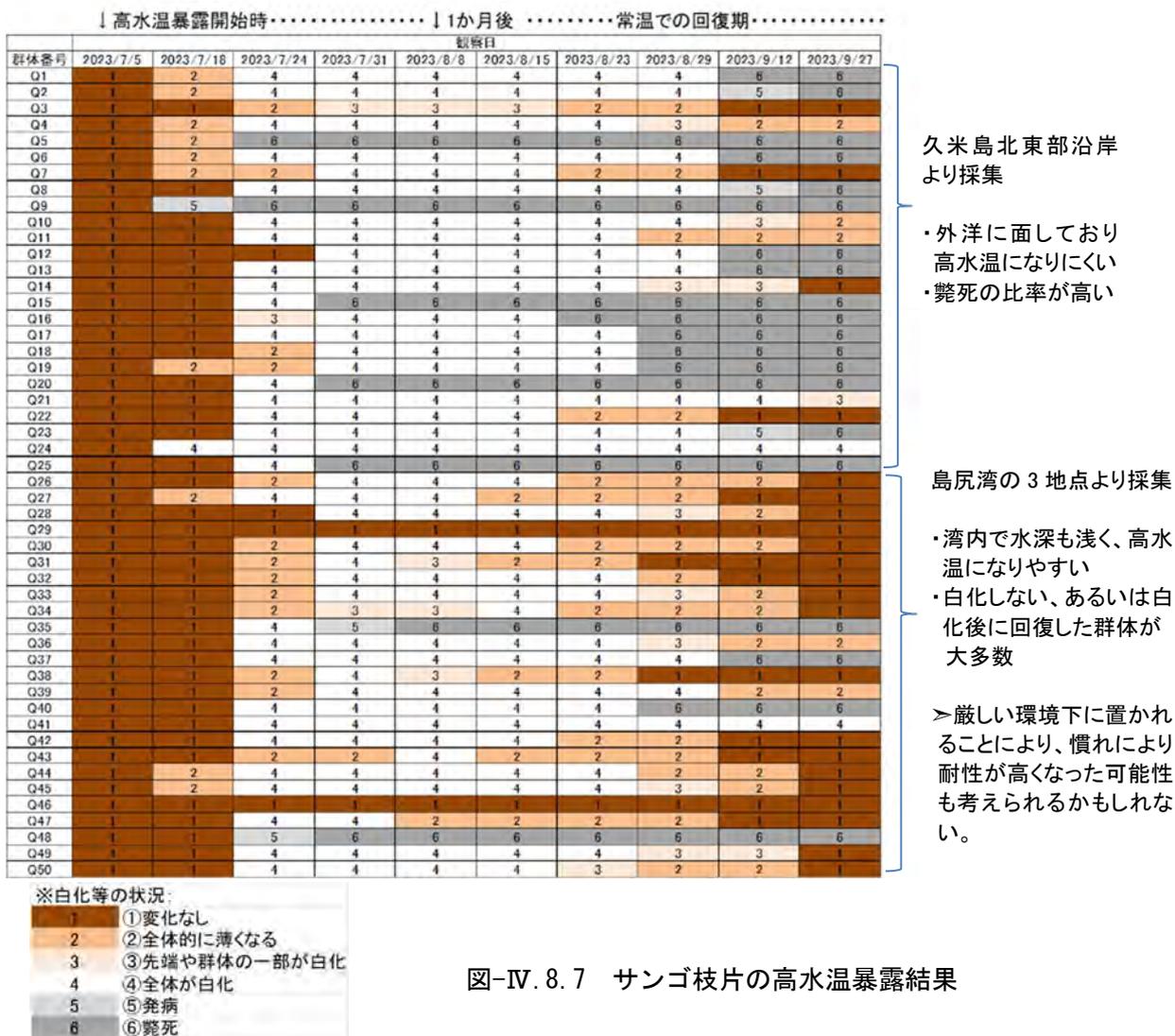


図-IV. 8. 7 サンゴ枝片の高水温暴露結果



図-IV. 8. 8 高水温暴露におけるサンゴ枝片の状況

高水温暴露したサンゴの DNA 型について、本年度の結果とともに 2018 年および 2022 年に実施した同様な実験の結果も表-IV.8.2 に一緒に示す。高水温暴露実験結果と DNA 型の一致率が低くなっており、TTAT ホモの塩基配列が高水温耐性の正しい DNA マーカーであるとは判定できない結果となった。

表-IV.8.2 高水温暴露したサンゴ群体の DNA 型

2018 年採集体				2023 年採集体									
採集海域	群体番号	水槽高水温暴露結果	SNP型	採集海域	群体番号	水槽高水温暴露結果	SNP型						
久米島 北東沿岸 水深 10-15m	K1	低	T/C T/G A/C T/C	久米島 北東沿岸 水深 11-15m	Q1	低	C/C G/G C/C C/C						
	K2	高	T/T T/T A/A T/T		Q2	低	C/C C/C C/C C/C						
	K3	高	C/C C/C C/C C/C		Q3	高	T/T T/T A/A T/T						
	K4	高	T/T T/T A/A T/T		Q4	低	C/C C/C C/C C/C						
	K5	中	T/T T/T A/A T/T		Q5	低	解析不能						
	K6	低	T/T T/T A/A T/T		Q6	低	C/C C/C C/C C/C						
	K7	中	T/T T/T A/A T/T		Q7	低	C/C C/C C/C C/C						
	K8	中	C/C G/G C/C G/G		Q8	低	T/T T/T A/A T/T						
	K9	低	C/C G/G A/C T/C		Q9	低	C/C C/C C/C C/C						
久米島 南東沿岸 水深 約5m	K10	低	C/C G/G C/C G/G		Q10	低	T/T T/T A/A T/T						
	K11	高	T/T T/T A/A T/T		Q11	低	C/C G/G C/C C/C						
	K13	中	未解析		Q12	低	C/C C/C C/C C/C						
	K14	中	T/T T/G A/C T/T		Q13	低	T/T T/T A/A T/T						
	K15	高	T/C G/T C/A T/C		Q14	低	C/C G/G C/C C/C						
	K16	低	T/C T/G A/C T/C		Q15	低	C/C G/G C/C C/C						
	K17	低	未解析		Q16	低	C/C G/G C/C C/C						
	K18	低	T/T T/T A/A T/T		Q17	低	C/C G/G C/C C/C						
	K19	低	未解析		Q18	低	C/C G/G C/C C/C						
久米島南東沿岸 水深:約2m	K20	低	未解析		Q19	低	C/C G/G C/C C/C						
	K21	高	T/T T/T A/A T/T		Q20	低	解析不能						
2022 年採集体	採集海域	群体番号	水槽高水温暴露結果		SNP型	採集海域	群体番号	水槽高水温暴露結果	SNP型				
										久米島 南東沿岸 島尻湾内 水深 2-6m	Q21	低	C/C G/G C/C C/C
											Q22	低	解析不能
											Q23	低	T/T T/T A/A T/T
											Q24	低	C/T G/G C/C C/T
				Q25							低	C/C C/C C/C C/C	
				Q26							低	T/C G/T C/A T/C	
				Q27							低	T/T T/T A/A T/T	
				Q28							低	C/C G/G C/C C/C	
				Q29							高	C/C G/G C/C C/C	
				Q30							低	C/C C/C C/C C/C	
				Q31							高	T/T T/T A/A T/T	
				Q32							低	解析不能	
				Q33							低	C/C G/G C/C C/C	
				Q34							高	C/C G/G C/C C/C	
				Q35							低	C/C G/G C/C C/C	
				Q36							低	T/C G/T C/A T/C	
				Q37							低	T/T T/T A/A T/T	
				Q38							高	T/T T/T A/A T/T	
				Q39							低	T/C G/G C/A T/C	
				Q40							低	C/C C/C C/C C/C	
				Q41							低	T/T T/T A/A T/T	
Q42	低	C/C G/G C/C C/C											
Q43	低	C/C G/G C/C C/C											
Q44	低	T/T T/T A/A T/T											
Q45	低	T/C G/T C/A C/T											
Q46	高	C/C G/G C/C C/C											
Q47	高	T/T T/T A/A T/T											
Q48	低	T/T T/T A/A T/T											
Q49	低	C/C G/G C/C C/C											
Q50	低	C/C G/G C/C C/C											

## 2.3 高水温耐性遺伝型の次世代への伝播の確認

### (1) 目的

高耐性の親同士の交配により、高耐性が次世代の稚サンゴに引き継がれるかを検証することを目的として、親群体およびその配偶子、ならびに交配により得られた稚サンゴの遺伝型を調べた。

### (2) 方法

過年度において遺伝型を解析した親群体を用いて、以下の項目について遺伝型を調べた。

- ・放出した卵と精子
- ・遺伝的に高耐性と判別された親群体（TTAT ホモの DNA マーカーを持つ群体）より得られた卵と精子を交配して得られた稚サンゴ

### (3) 結果

親サンゴおよびその配偶子の遺伝型の判別結果を表-IV.8.3 に示す。ほとんどのケースにおいて、親サンゴと卵もしくは精子の遺伝型が一致しなかった。

また、親と子の遺伝型の関係を表-IV.8.4 に示す。こちらも不可解な結果となっており、TTAT ホモの親サンゴ同士の子はすべて TTAT ホモになるはずであるが、ほとんどのケースにおいて子の遺伝型が親と異なっており、メンデルの法則に反していた。

表-IV.8.3 卵および精子の DNA 解析結果

サンプル番号	サンプル内容 (親のSNP型)	SNP型			
N1	群体番号 B14由来の精子 (C/T, G/T, C/A, C/T)	T/C	G/T	C/A	T/C
N2	群体番号 B14由来の卵 (C/T, G/T, C/A, C/T)	T/C	G/T	C/A	T/C
N3	群体番号 K21由来の精子 (T/T, T/T, A/A, T/T)	C/C	G/G	C/C	C/C
N4	群体番号 K21由来の卵 (T/T, T/T, A/A, T/T)	C/C	G/G	C/C	C/C
N5	群体番号 B4由来の精子 (T/T, T/T, A/A, T/T)	T/T	T/T	A/A	T/T
N6	群体番号 B4由来の卵 (T/T, T/T, A/A, T/T)	T/C	G/T	C/A	T/C
N7	群体番号 B10由来の精子 (T/T, T/T, A/A, T/T)	T/T	T/T	A/A	T/T
N8	群体番号 B10由来の卵 (T/T, T/T, A/A, T/T)	C/T	G/G	C/A	C/T
N9	群体番号 B22由来の精子 (T/T, T/T, A/A, T/T)	C/C	G/G	C/C	C/C
N10	群体番号 B22由来の卵 (T/T, T/T, A/A, T/T)	解析不能			
N11	群体番号 B20由来の精子 (T/T, T/T, A/A, T/T)	T/T	T/T	A/A	T/T
N12	群体番号 B20由来の卵 (T/T, T/T, A/A, T/T)	T/C	G/G	C/A	T/C

表-IV.8.4 親子のDNA解析結果

		精子		
群体系号	4	10	21	
卵	4	-	○	
	10	-	○	
	21	×	○	

使用した親サンゴ (計3群体系)

※以下のTTATホモの3群体系が2023年5月14日に産卵し、その卵と精子を用いて交配

No. 4: 2022年に採集したNo.4

No. 10: 2022年に採集したNo.10

No. 21: 2018年に採集したNo.21

※他のTTATホモ群体系は、産卵日がすれたため交配できず

※○：種苗生産成功(受精率ほぼ100%)、×：種苗生産失敗(受精率0%)

サンプル番号	親のSNP型	配偶子のSNP型	親のSNP型	配偶子のSNP型	サンプル番号	親のSNP型	配偶子のSNP型	サンプル番号	親のSNP型	配偶子のSNP型	種サンゴのSNP型	種サンゴのSNP型
R1	B4	卵B4	B10	卵B10	R21	B10	卵B10	R41	K21	卵K21	C/C G/G C/C C/C	C/C G/G C/C C/C
R2	K21	T/C, G/T, C/A, T/C	K21	C/T, G/G, C/A, C/T	R22	K21	C/T, G/G, C/A, C/T	R42	B10	×	解析不能	解析不能
R3	両方とも	×	両方とも	×	R23	両方とも	×	R43	両方とも	×	C/C G/G C/C C/C	T/C T/G A/C T/T
R4	TTATホモ	精子K21	両方とも	精子K21	R24	TTATホモ	精子K21	R44	TTATホモ	精子B10	C/C G/G C/C C/C	T/T T/G A/C T/T
R5		C/C, G/G, C/C, C/C	TTATホモ	C/C, G/G, C/C, C/C	R25		C/C, G/G, C/C, C/C	R45			T/T T/A A/T T/T	C/C G/G C/C C/C
R6					R26		解析不能	R46			T/T T/A A/T T/T	T/T T/T A/A T/T
R7					R27		T/C G/T A/C T/C	R47			T/C T/G A/C T/C	T/C G/T A/C T/T
R8					R28		T/T T/T A/A T/T	R48			解析不能	C/C G/G C/C C/C
R9					R29		解析不能	R49			C/C G/G C/C C/C	T/C T/G A/C T/T
R10					R30		T/C G/T A/C T/C	R50			C/C G/G C/C C/C	T/C G/G C/C C/C
R11					R31		T/C T/G A/C T/C	R51			C/C G/G C/C C/C	C/C G/G C/C C/C
R12					R32		C/C G/G C/C C/C	R52			C/C G/G C/C C/C	C/C G/G C/C C/C
R13					R33		T/T T/T A/A T/T	R53			解析不能	解析不能
R14					R34		T/T T/T A/A T/T	R54			T/C T/G A/C T/C	C/C G/G C/C C/C
R15					R35		T/T T/T A/A T/T	R55			C/C G/G C/C C/C	C/C G/G C/C C/C
R16					R36		T/C G/T A/C T/C	R56			解析不能	T/C G/T A/C T/C
R17					R37		T/T T/T A/A T/T	R57			解析不能	解析不能
R18					R38		解析不能	R58			T/T T/G A/C T/T	C/C G/G C/C C/C
R19					R39		T/T T/T A/A T/T	R59			C/C G/G C/C C/C	C/C G/G C/C C/C
R20					R40		T/C G/T A/C T/C	R60			解析不能	解析不能

## 2.4 高耐性および低耐性親サンゴ由来の配偶子を用いて生産した稚サンゴの高水温暴露実験

過年度に実施した「組み合わせ交配サンゴ」の高水温暴露における、生残率の結果を表IV.8.5に示す。

表-IV.8.5 「組み合わせ交配サンゴ」の高水温暴露における生残率

2019年実施実験

		精子			
		K-8 (中耐性)	K-15 (高耐性)	K-18 (低耐性)	K-21 (高耐性)
卵	K-8 (中耐性) C/C, G/G, C/C, G/G	-	85.7%	31.4%	100.0%
	K-15 (高耐性) T/C, G/T, C/A, T/C	-	-	32.2%	53.6%
	K-18 (低耐性) T/T, T/A, A/T, T	39.1%	45.5%	-	64.3%
	K-21 (高耐性) T/T, T/A, A/T, T	-	26.4%	-	-
	T/T, T/A, A/T, T	-	-	-	-

2020年実施実験

		精子				
		K-10 (低耐性)	K-18 (低耐性)	K-8 (中耐性)	K-14 (中耐性)	K-21 (高耐性)
卵	K-10 (低耐性) C/C, G/G, C/C, G/G	-	42%	67%	55%	78%
	K-18 (低耐性) T/T, T/A, A/T, T	31%	-	35%	61%	70%
	K-8 (中耐性) C/C, G/G, C/C, G/G	74%	32%	-	60%	46%
	K-14 (中耐性) T/T, T/G, A/C, T/T	38%	23%	-	-	31%
	K-21 (高耐性) T/T, T/A, A/T, T	47%	49%	71%	38%	-
	T/T, T/A, A/T, T	-	-	-	-	-

2022年実施実験

		精子							
		B-2 (低耐性)	K-3 (高耐性)	B-12 (低耐性)	B-13 (高耐性)	B-19 (高耐性)	B-20 (高耐性)	K-21 (高耐性)	B-22 (低耐性)
卵	B-2 (低耐性) C/C, G/G, C/C, C/C	-	16.3%	4.3%	5.0%	-	-	28.8%	6.5%
	K-3 (高耐性) C/C, C/C, C/C, C/C	17.7%	-	-	19.2%	-	-	-	29.9%
	B-12 (低耐性) T/T, T/T, A/A, T/T	25.4%	-	-	-	-	-	54.0%	-
	B-13 (高耐性) C/C, G/G, C/C, C/C	37.4%	28.6%	-	-	-	-	-	8.1%
	B-19 (高耐性) C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	-	-	-	-	-	-
	B-20 (高耐性) T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	-	40.5%	-	-	-
	K-21 (高耐性) T/T, T/T, A/A, T/T	33.0%	-	36.4%	-	-	-	-	-
	B-22 (低耐性) T/T, T/T, A/A, T/T	23.1%	16.4%	-	1.9%	-	-	-	-
	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	-	-	-	-	-

表現型が高耐性の親由来の配偶子を交配した稚サンゴにおいて、他の組み合わせより生残率が高い傾向は見られなかった。

遺伝型に関しては、2022年の実験においてのみ、TTATホモの親同士由来の稚サンゴで生残率が有意に高かったが（Fisher 確率検定、 $p < 0.05$ ）、他の年に実施した実験においては、その傾向は見られなかった。

2021年実施実験

		精子		
		K-10 (低耐性)	K-18 (低耐性)	K-21 (高耐性)
卵	K-10 (低耐性) C/C, G/G, C/C, G/G	-	0	-
	K-18 (低耐性) T/T, T/T, A/A, T/T	0	-	0.7%
	K-21 (高耐性) T/T, T/T, A/A, T/T	-	0	-

上記の 2019 年および 2020 年に実施した高水温暴露実験における、高水温暴露前後の TTAT ホモ群体の全群体数に対する比率を表-IV.8.6 に示す。高水温暴露後に TTAT ホモの比率が高くなるべきであるが、その傾向は見られなかった。また、2020 年産稚サンゴでは、TTAT ホモ親群体同士由来の稚サンゴにおいて、TTAT ホモの遺伝型の出現率が低かった（本来は 100%となるべき）。

表-IV.8.6 「組み合わせ交配サンゴ」の高水温暴露前後における TTAT ホモ群体の比率  
 (矢印の右が高水温暴露前、左が高水温暴露後の全生残群体数に対する TTAT ホモ群体の比率)

		精子				
群体番号 (表現型) 遺伝型	群体番号 (表現型) 遺伝型	K-8 (中耐性)	K-15 (高耐性)	K-18 (低耐性)	K-21 (高耐性)	
		C/C, G/G, C/C, G/G	T/C, G/T, C/A, T/C	T/T, T/T, A/A, T/T	T/T, T/T, A/A, T/T	
卵	K-8 (中耐性) C/C, G/G, C/C, G/G		20% → 40%	57% → 20%	40% → 50%	
	K-15 (高耐性) T/C, G/T, C/A, T/C	-		85% → 60%	93% → 100%	
	K-18 (低耐性) T/T, T/T, A/A, T/T	35% → 40%	100% → 100%		100% → 100%	
	K-21 (高耐性) T/T, T/T, A/A, T/T	-	83% → 100%	-		
		精子				
群体番号 (表現型) 遺伝型	群体番号 (表現型) 遺伝型	K-10 (低耐性)	K-18 (低耐性)	K-8 (中耐性)	K-14 (中耐性)	K-21 (高耐性)
		C/C, G/G, C/C, G/G	T/T, T/T, A/A, T/T	C/C, G/G, C/C, G/G	T/T, T/G, A/C, T/T	T/T, T/T, A/A, T/T
卵	K-10 (低耐性) C/C, G/G, C/C, G/G		60% → 50%	20% → 50%	60% → 100%	0% → 0%
	K-18 (低耐性) T/T, T/T, A/A, T/T	20% → 50%		60% → 25%	100% → 100%	0% → 25%
	K-8 (中耐性) C/C, G/G, C/C, G/G	0% → 25%	60% → 0%		20% → 25%	0% → 0%
	K-14 (中耐性) T/T, T/G, A/C, T/T	60% → 50%	100% → 50%	-		100% → 25%
K-21 (高耐性) T/T, T/T, A/A, T/T	40% → 0%	20% → 0%	0% → 25%	50% → 0%		

## 2.5 沖ノ鳥島由来の稚サンゴにおける高水温暴露前後の遺伝型の変化

沖ノ鳥島産ウスエダ 9 群体の配偶子を混合して 2019 年 6 月に種苗生産した稚サンゴを用いて、2019 年 7 月に約 2 か月間の高水温暴露を行い、高耐性群体の選抜を行った。

高水温暴露前の群体数は 672 群体で、暴露直後には 80 群体が生残した。その後は、常温で飼育し、2023 年 5 月の生残数は 50 群体であった。

高水温暴露前に、種苗生産した稚サンゴから 50 個体をランダムに採集し CHAOS 溶液で固定し、2022 年度にこれらのサンプルの DNA 解析を実施した。また、今年度においては、生残した 50 群体すべてについて DNA 解析を行った。

高水温暴露前後におけるサンゴの各 DNA 型の比率を表-IV.8.7 に示す。暴露後に生残したサンゴにおいては、TTAT ホモの比率が高くなると想定されたが、実際にはそのようにはなっておらず、高耐性ではない CGCC ホモの比率が高まっていた。

一方、サンプル番号 1~29 の群体は、常温育期間中において一貫して健全な状態であり、また TTAT ホモの意率が高かったが、サンプル番号 30~50 の群体は白化や罹患を経験しており、TTAT ホモの比率が低かった。病気や白化経験の有無と、TTAT かそれ以外の遺伝型かの関係は、統計的に有意であるとされた ( $\chi$  二乗検定、 $p < 0.001$ )。TTAT ホモ群体は、高水温耐性だけでなく、免疫的にも高い耐性を持つ可能性があるのかもしれない。

表-IV.8.7 沖ノ鳥島産稚サンゴにおける高水温暴露前後の遺伝子型の変化 (下表は各群体の DNA 型詳細結果)

	高水温暴露前		高水温暴露後	
	2019年採集サンプル		2023年採集サンプル	
	群体数	比率	群体数	比率
TTATホモ	37	74%	30	60%
CGCCホモ	4	8%	17	34%
ヘテロ	9	18%	2	4%
解析不可	0	0%	1	2%
	50		50	

サンプル番号	高水温暴露前(2019年)のDNA解析結果				高水温暴露後(2023年)のDNA解析結果			
1	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
2	T/C	T/G	A/C	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
3	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
4	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
5	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	A/A	T/T
6	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
7	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
8	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
9	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
10	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
11	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
12	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
13	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
14	T/C	G/T	C/A	C/T	C/C	G/G	C/C	C/C
15	T/T	T/G	A/C	T/T	解析不可			
16	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
17	T/C	G/T	A/C	C/C	T/T	T/T	A/A	T/T
18	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
19	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
20	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
21	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
22	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
23	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
24	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
25	T/T	T/G	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
26	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
27	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
28	T/T	T/G	A/C	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
29	T/T	T/T	A/A	T/T	T/C	G/T	A/C	T/T
30	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
31	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
32	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
33	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
34	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	A/A	T/T
35	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
36	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
37	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C
38	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
39	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
40	T/C	G/T	C/C	T/C	C/C	G/G	C/C	C/C
41	T/C	T/G	A/C	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
42	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
43	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
44	T/C	G/G	C/A	C/T	T/T	T/T	A/A	T/T
45	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
46	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C
47	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
48	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T
49	C/C	G/G	C/C	C/C	C/T	G/T	C/A	C/T
50	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T

## 2.6 実験および解析結果の検討

過年度および今年度の高水温暴露実験および DNA 解析において、「表現型および遺伝型が高耐性の親サンゴから種苗生産した稚サンゴにおいて高水温での生残率が高くない」、「親子の遺伝型が異なる」等の不可解な結果が生じている。このため、遺伝学が専門のお茶の水女子大学服田教授および東京大学大気海洋研究所新里准教授、水産学全般が専門の佐賀大学鹿熊特任教授、技術開発担当の水産土木建設技術センター中村により、問題点の抽出および今後の方針を検討するために打ち合わせを行った。検討結果は表-IV.8.8 の通りであり、来年度以降のサンゴの DNA マーカー育種における技術開発の方針案が作成された。

表-IV.8.8 高水温暴露実験および DNA 解析における課題点と今後の方針案

課題点(不可解な点)	考えられる要因	解決案および今後の方針案
[遺伝学的研究] ①DNA 解析において、親子の遺伝型がメンデルの法則と一致しない  ②高水温暴露で高耐性を示した親群体(表現型が高水温耐性)において TTAT ホモの SNP 型を持つ群体の比率が高くない  ③高水温暴露後に、TTAT ホモの SNP 型(遺伝型)を持つ稚サンゴの比率が増えていない	・PCR において、目的とする DNA 領域以外の箇所も増幅させている(プライマーが不完全)	①PCR により増幅されている DNA 量を調べ、マルチコピーが生じていないか確認 ②プライマーの改善  ⇒まずは上記の解決策①を実施し、その結果により、②に進めるか、あるいは新たな問題がないかを検討
	・高水温耐性 DNA マーカー(TTAT ホモ)が正しくない	①全ゲノム解析をやり直し、新たな DNA マーカーの探索  ⇒3 年程度かかることが想定されるため、本事業(第 3 フェーズ)では実施しないが、開発方法案を示す
[稚サンゴの高水温暴露実験] ①表現型が高耐性同士の親群体由来の稚サンゴにおいて、高水温暴露後の生残率が高くない	・1 つの DNA 領域だけでなく、複数の遺伝子が高水温耐性に関与している	①高耐性および低耐性の親群体由来の稚サンゴの高水温暴露において、交配の組み合わせ数を増やして実施(これにより、何らかの傾向が見える可能性がある)  ⇒高耐性および低耐性のそれぞれ 5 群体程度から得られた配偶子を用いて生産した稚サンゴ(90 通りの組み合わせを目標)を高水温暴露し、各組み合わせの生残率を調べる

### 3 従来法（選抜育種）による高水温耐性サンゴの育種

#### (1) 目的

本技術開発では、DNA マーカー育種の技術が確立される以前から、様々な生物において利用されている「従来の育種法（選抜育種）」も用いて技術開発を行っている。

0歳時に高水温で選抜した稚サンゴが、成長後も高水温耐性を維持し続けることを確認しており、これまでのところ3歳時点でも高水温耐性を維持していた。今年度においても、これらの群体を高水温に暴露して4歳齢時点でも高水温耐性を維持しているかどうかについて調べた。さらに、これらの群体の一部は海域にて飼育を行い、海域の環境に適応可能かどうか調べた。

#### (2) 方法

2019年に久米島産ウスエダミドリイシを用いて種苗生産し、0歳齢および1、2、3歳齢の時点での高水温暴露実験で生残した稚サンゴを再度高水温に暴露した。また、一部の群体については、海域の環境に適応できるかどうか検証するために、昨年度より海域飼育を行っている。本年度は、以下の飼育条件で4歳齢サンゴを飼育し、生残状況を調べた（図-IV.8.9）。

- |                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| ①水槽内にて高水温で飼育（31.5℃、9月27日より1か月間）  | 10 群体 |
| ②海域（久米島、島尻湾）の棚にて飼育（2023年7月22日開始） | 17 群体 |
| ③水槽内において常温にて継続飼育（2023年7月22日開始）   | 15 群体 |



高水温暴露水槽



海域飼育状況



通常飼育水槽



久米島

野外飼育海域  
(赤丸で示した海域)

図-IV. 8. 9  
高水温選抜サンゴの  
異なる飼育条件下で  
の飼育状況および  
海域飼育地点

### (3) 結果および考察

本年度の水槽および海域での飼育結果を表-IV.8.9 に示す。水槽内および海域間における生残率に統計的な有意差はなかった (Fisher 確率検定、 $p=1$ )。4 歳令においても、野外環境に適応可能と考えられる。

高水温暴露の結果を表-IV.8.10 に示す。水槽内の高水温暴露実験区と対照実験区間において統計的に有意差なかった (Fisher 確率検定、 $p=1$ )。このことから、4 歳齢でも高水温耐性を維持していると考えられる。

サンゴは、生物学的最小形を超える群体サイズから、各群体の様々な生態的な特徴が変化すると考えられるが (例えば、共生する褐虫藻の優占タイプがクレード D から C へ変化するなど)、今回の実験に用いた 4 歳齢のサンゴは直径が 13~20cm であり、すでに性的に成熟可能なサイズである。このことから、4 歳齢以上では生態的な特徴は変化しづらく、高水温耐性は今後も維持できる可能性が高いと思われる。結論として、高水温耐性稚サンゴを生産する技術として、0 歳齢稚サンゴの高水温暴露は有効であると考えられる。

表-IV.8.9 水槽および海域での飼育におけるサンゴの生残

	生残群体数		
	2022年7月	2022年9月	2023年9月
水槽内常温	15 (100%)	13 (86.7%)	13 (86.7%)
海域飼育	17 (100%)	16 (94.1%)	14 (82.4%)

Fisher 正確確率検定、 $p=1$

表-IV.8.10 水槽での高水温におけるサンゴの生残

	高水温開始時	高水温終了時	高水温終了1か月後
	2023年9月	2023年10月	2023年11月
	群体数(生残率)	群体数(生残率)	群体数(生残率)
水槽内高水温	10 (100%)	9 (90.0%)	9 (90.0%)
対照区(水槽内常温)	13 (100%)	13 (100.0%)	13 (100.0%)

Fisher 正確確率検定、 $p=1$

## 4 引用文献

- Barshis DJ, Ladner JT, Oliver TA, Seneca FO, Traylor-Knowles N, Palumbi SR (2013) Genomic basis for coral resilience to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4), 1387-1392
- Dixon GB, Davies SW, Aglyamova GV, Meyer E, Bay LK, Matz MV (2015) Genomic determinants of coral heat tolerance across latitudes. *Science*, 348(6242), 1460-1462
- Humanes A, Beauchamp EA, Bythell JC, Carl MK, Craggs JR, Edwards AJ, Golbuu Y, Lachs L, Martinez HM, Palmowski P, Paysinger F, Randle JL, van der Steeg E,

Sweet M, Treumann A, Guest JR (2021) An Experimental Framework for Selectively Breeding Corals for Assisted Evolution. *Front. Mar. Sci.* 8:669995. doi: 10.3389/fmars.2021.669995

Mascarelli A (2014) Designer reefs: biologists are directing the evolution of corals to prepare them to fight climate change. *Nature*, 508(7497), 444-447.

van Oppen MJ, Oliver JK, Putnam HM, Gates RD (2015) Building coral reef resilience through assisted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), 2307-2313