

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 過年度の成果	IV-8-1
2.1 高水温耐性 DNA マーカーの開発	IV-8-1
2.2 高水温耐性の次世代への遺伝的継承の検証	IV-8-5
3 今年度の成果	IV-8-6
3.1 高水温耐性 DNA マーカーの開発	IV-8-6
(1) 目的	IV-8-6
(2) 方法	IV-8-6
(3) 結果	IV-8-7
(4) まとめ	IV-8-8
2.2 高水温耐性の次世代への遺伝的継承の検証	IV-8-9
(1) 目的	IV-8-9
(2) 方法	IV-8-9
(3) 結果	IV-8-10
(4) まとめ	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。

ウスエダミドリイシを対象種とした高水温耐性種苗の選抜育種については、2023 年度までに技術開発を完了している。本事業で技術開発した、高水温耐性を持つサンゴ (種:ウスエダミドリイシ) の種苗生産方法は以下の通りである。

- ・ 親サンゴより得られた卵と精子を用いて有性生殖法により稚サンゴを生産
- ・ 生産した稚サンゴを約 1 か月齢で、水温 31.5℃において約 2 か月間飼育することにより高い高水温耐性を持つ稚サンゴを選抜
- ・ 選抜後は、常温にて 4 歳齢まで飼育

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)、本技術開発の実験に用いた 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。

2 過年度の成果

2.1 高水温耐性 DNA マーカーの開発

DNA マーカー育種の技術とは、高水温耐性を持つサンゴ群体を高水温耐性 DNA マーカー*1により特定し、これらの子孫を有性生殖法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、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・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。

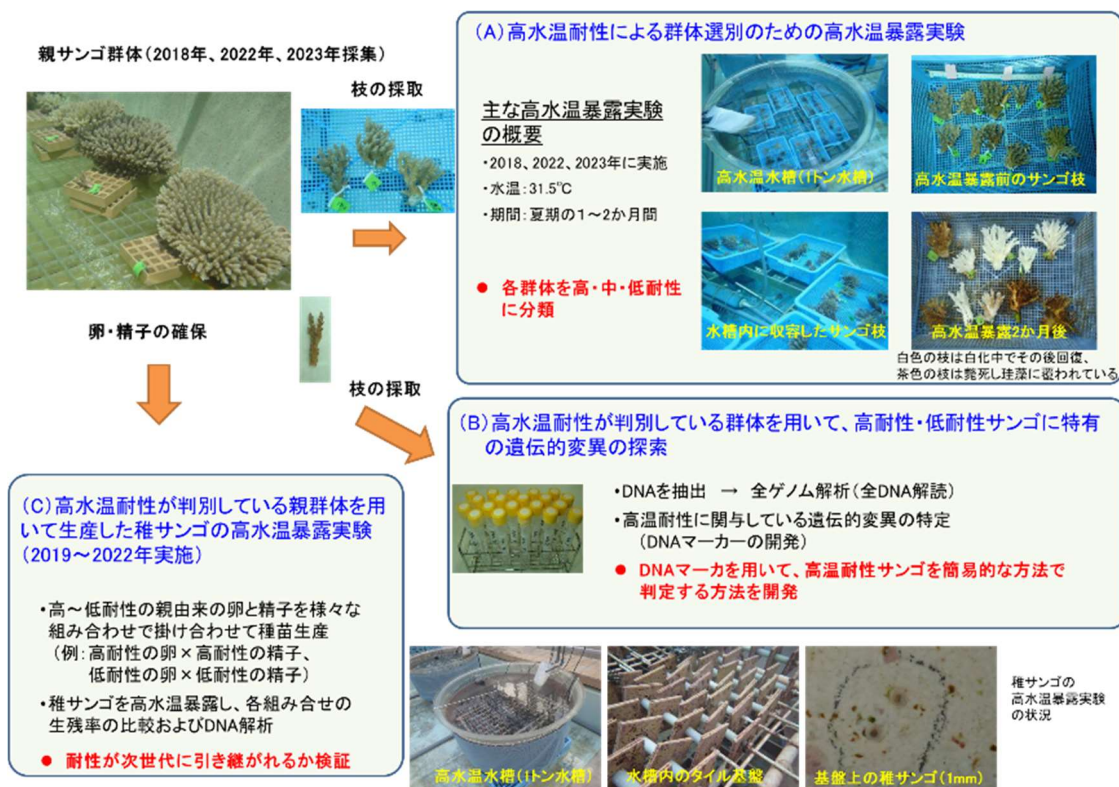
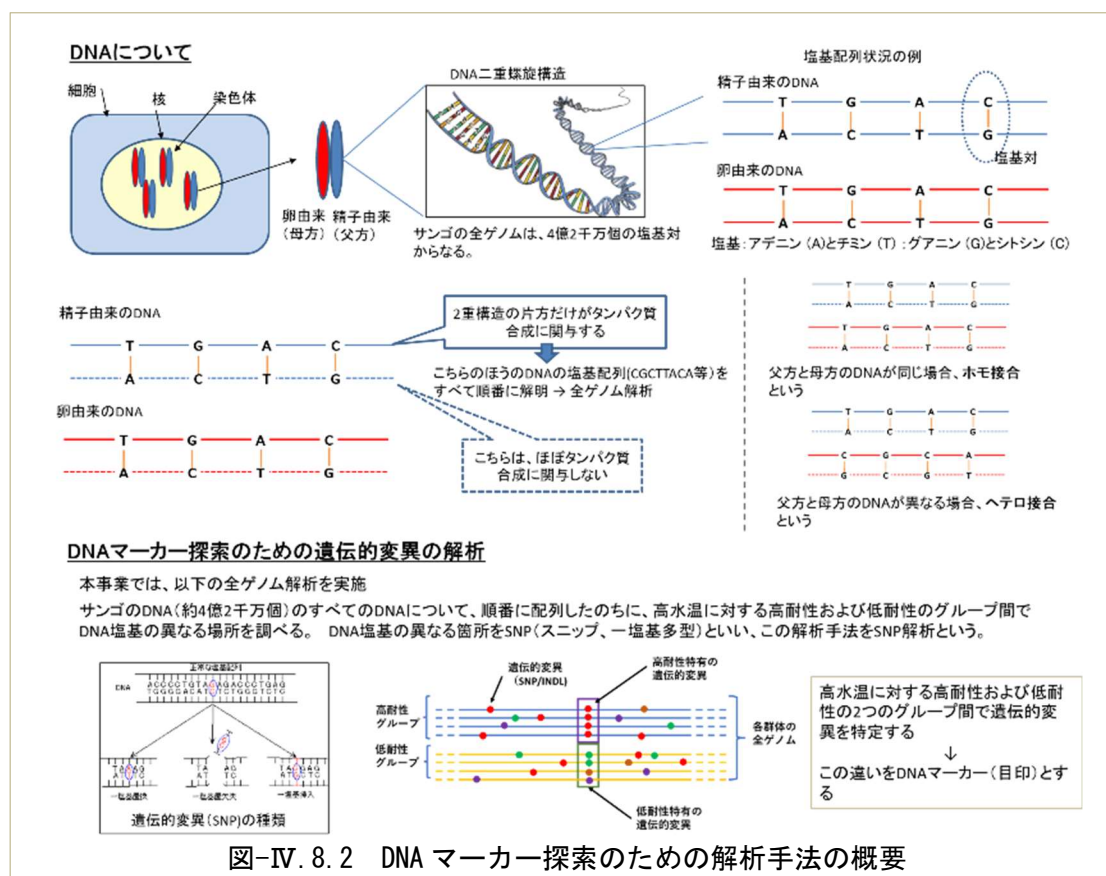


図-IV. 8. 1 DNA マーカー開発のための実験の流れ



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'- TGTAAGCTCCTAGCATCTCAGG -3'

※上記のプライマーは、4 箇所 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 回繰り返して、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。

2022 年度および 2023 年度においては、この高水温耐性 DNA マーカーが正しいかどうかを検証するために、開発済みのプライマーを用いて PCR を行い、高水温で生残した親サンゴおよび稚サンゴのマーカー領域の DNA を増幅し、塩基配列を判読する実験を繰り返して行った。また、親サンゴとその群体の精子と卵子の遺伝子型が一致するかも、同様の PCR 手法で検査した。その結果、親と卵・精子の遺伝型が一致しない、また、高水温で生残した群体の遺伝型 (SNP 型) が高水温耐性 DNA マーカーの塩基配列と一致しないという問題点が生じた。このため、2023 年度末の検討委員会において検討を行い、表・IV.8.2 の通り問題点を特定するとともに、解決に向けた今後の研究方針案が策定された。

表-IV.8.2 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] ① DNA 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)	① PCR 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

2.2 高水温耐性の次世代への遺伝的継承の検証

2019 年度より 2023 年度まで、「組み合わせ交配サンゴ」を用いた高水温暴露実験を行ってきたが、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}に関しても、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。

^{*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。

このため、この問題点についても 2023 年度末の検討委員会において、表-IV.8.3 の通り問題点を特定するとともに、解決のための今後の研究方針案が策定された。

表-IV.8.3 稚サンゴの高水温暴露実験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
[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 今年度の成果

3.1 高水温耐性 DNA マーカーの開発

(1) 目的

本年度は、昨年度の検討委員会での研究方針案に則り、当該 SNP 箇所を PCR で増幅する正確性と特異性の向上に取り組んだ。具体的には、当該 SNP 箇所のさらに外側に新規のプライマーを複数作成し、それらを用いて PCR による増幅を行った (1st PCR)。その後に、上記の過年度に開発したプライマーを用いて PCR (2nd PCR) を行い、SNP 型の特定が改善されるのかを確認した。

(2) 方法

1) 当該 4 箇所の SNP が位置する外側ゲノム領域での新規プライマー作成

ウスエダミドリイシの全ゲノム情報 (Shinzato et al., 2021. MBE) から、当該 4 箇所の SNP の周辺ゲノム領域、約 5000 塩基程度を選抜した。Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/>) を用いて、これまで使用していたプライマーペア (s57F, s57R) の外側に位置し、1000 から 3000 塩基程度を増幅する PCR プライマーペア (Fw, Rv) を複数作成した。多様な群体のサンプルから PCR で増幅するには、作成されたプライマー箇所に個体差 (SNP) が極めて少ないことが求められる。そこで、これまでに本事業で全ゲノム SNP 解析を行った複数群体の SNP 情報を参照し、Primer3Plus で作成されたプライマーが結合するゲノム領域の SNP を確認し、SNP の含有量が少ないプライマーペアを選抜した。SNP の塩基配列を考慮した、一部を混合塩基としたプライマー (degenerate primer) も作成した。

2) 新規作成したプライマーの PCR 増幅確認と当該 SNP の特異性の確認

増幅可能な全ての新規プライマーの組み合わせで 1st PCR を行い、その後 s57F, s57R プライマーで 2nd PCR を行った。当該の 4 箇所の SNP 箇所を的確に増幅し、TTAT ホモを持つとされる群体は正確に TTAT と SNP 型判定されるのかを確認するため、これまでに本事業で使用した以下の DNA サンプルを用いた。

- ・ 2018 年に種苗生産のために採捕された久米島産のウスエダミドリイシで、TTAT のホモと判定された 4 群体 (B4, B10, B22, B20)
- ・ 上記の親群体由来の精子サンプル (N5, N7, N9, N11)
- ・ これまでに全ゲノム SNP 解析により SNP 型を特定した群体から、DNA 配列解読量が多く SNP 判定の正確性が高いと判断される群体から、TTAT を持つと判定された群体 (K21, O205, O219, O228) と TTAT 以外と判定された群体 (K9, K16)

(3) 結果

1) 当該 4 箇所の SNP が位置する外側ゲノム領域での新規プライマー作成

Primer3Plus を用いて、5 種類の Fw プライマー（図-IV.8.3, 黄色、表-IV.8.4）、3 種類の Rv プライマー（図-IV.8.3, 赤、表-IV.8.4）を作成し、PCR 増幅可能な 15 の組み合わせ（Fw 5 種類 X Rv 3 種類）で PCR を行った。表-IV.8.5 にプライマーの組み合わせと想定される 1st PCR の増幅サイズの例を示す。

その後 s57F と s57R プライマーを用いて 2nd PCR を行い、TTAT ホモとされる群体が正確に TTAT と判定されるのかを検証し、最適のプライマーの組み合わせを選抜した。

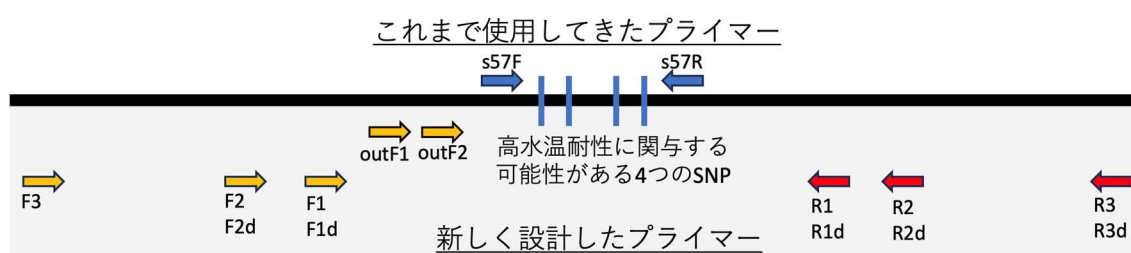


図-IV. 8. 3 高水温耐性に関与する可能性のある 4 箇所の SNP が位置するゲノム領域と設計したプライマーのゲノム上の位置関係

過年度に当該箇所を増幅するのに使用したプライマー（s57F, s57R）を上にし、新規で作成したプライマーを下部網掛けで示す。Fw プライマーを黄色、Rv プライマーを赤で表示している。混合塩基を含むプライマーは名称の末尾に「d」が付いている。

表-IV. 8. 4 設計したプライマー

プライマー名	塩基配列
F1	CCAGCACTTAATTCAGCTTCAGACC
F1d	CCAGCACTTRATTCAGCTTCAGACC
R1	TGAATTACCGATCCGTGACTGTCTT
R1d	TGAATTACCGATCCNTGACWGTCTT
F2	TTCGATGGTCCAGAATTCCTTGTGT
F2d	TTYRATKGTCCAGAATTCCTTGTGT
R2	GGTCCACTAGCGGTGTTAATGAGTG
R2d	GGTCCACTAGCRNTGTTAATGAGTG
F3	ATCGCGTTGAAAGAGTGAGTGAAAG
R3	TTCTGGCCATCTAAACAGAAAACCA
R3d	TTCTGGYCATCTAAAMARAAAAYCA

表-IV.8.5 プライマーの組み合わせと想定される 1st PCR の増幅サイズの例

プライマーの組み合わせ	想定される 1st PCR の増幅サイズ
F1 (F1d) /R1 (R1d)	972 bp
F2 (F2d) /R2 (R2d)	1290 bp
F3/R1 (R1d)	2319 bp
F3/R2 (R2d)	2431 bp
outF1/R3	2711 bp
outF2/R3	2613 bp

2) 新規作成したプライマーの PCR 増幅確認と当該 SNP の特異性の確認

1st PCR のプライマーの増幅効率と、TTAT ホモとされる群体から実際に TTAT が確認されるのか、様々な群体から PCR 増幅が可能なのかを統合的に判断した結果、F3/R1 の組み合わせで 1st PCR を行うことが好ましいと判断した。いくつかのサンプルでは、F3/R1 の組み合わせで PCR 増幅ができなかった。その場合は 1st PCR で増幅が確認された組み合わせを採用した。

2018 年の種苗生産に使用された久米島産の群体で、TTAT ホモであると判定された 4 群体 (B4, B10, B22, B20)、それぞれの精子サンプル (N5, N7, N9, N11) で、TTAT ホモと判定された。B22 と N9 については、昨年度までの SNP 型判定では TTAT ホモとは判定されなかったが、今回は想定通り判定された。B4, B10, B22, B20 のサンプルについて、昨年度は結果が安定せず、PCR を何度か繰り返した上で TTAT と判定したが、今年度 2 段階の PCR を行うとすんなりと TTAT と判定することができた。

全ゲノム SNP 解析で TTAT ホモと判定された K21, O205, O219, O228 において、想定通り TTAT ホモと確認された。ゲノム解析で TTAT ホモ以外と判定された K9, K16 においても、ゲノム解析と同じ結果が得られた。

(4) まとめ

今回新規作成したプライマーを用いた 2 段階の PCR を行うことで、SNP 判定の精度向上が期待される。2022 年と 2023 年に行った久米島産のウスエダミドリイシを使用した高水温暴露実験や、高水温暴露実験後に生残した沖ノ鳥島産群体由来の稚サンゴなど、昨年度行った SNP 型判定においては、TTAT ホモと実際の高水温耐性の有無についての明確な関連性は確認できなかった (令和 5 年度本事業報告書)。昨年度実施した SNP 型判定は正確でなかった可能性もあるので、今年度作成したプライマーを用いた 2 段階 PCR によって再度 SNP 型を特定することで、TTAT ホモと高水温耐性の関連性についてより正確に検討することが可能になると考えられる。

2.2 高水温耐性の次世代への遺伝的継承の検証

(1) 目的

前述ように、「組み合わせ交配サンゴ」を用いた高水温暴露実験において、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という問題点がある。この問題点の解決の糸口を探るために、本年度は、高耐性および低耐性のそれぞれ5群体程度の親サンゴ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、各組み合わせの稚サンゴの生残率を調べた。

(2) 方法

対象種は久米島産のウスエダミドリイシとし、親サンゴは2018年および2023年に久米島周辺海域より採集し、サンゴ増殖研究所の水槽にて継続的に飼育している群体を用いた。これらのサンゴが2024年5月29日、31日および6月1日に産卵した卵と精子を群体別に確保し（高耐性7、低耐性5群体）、108通りの組み合わせで交配した後に、幼生を50mm角タイルに着生させて稚サンゴを生産した（図-IV.8.4）。着生後は、約1か月間サンゴ増殖研究所の5トン水槽で飼育した。約1か月齢の稚サンゴを1トン円形ポリカーボネート水槽に収容して高水温暴露実験を行った（図-IV.8.3）。1回目の高水温暴露は2024年7月23日～9月26日の期間に行った。実験開始時には常温の水温から1日1℃ずつ昇温し、終了時には常温の水温まで1日1℃ずつ降温した。31.5～32.0℃の高水温での飼育期間は61日間であった。

1回目の高水温暴露実験において、高耐性の親サンゴ由来の稚サンゴと低耐性の親サンゴ由来の稚サンゴの間に生残率の差が見られなかったことから、2024年12月27日～2025年2月1日において、より高い水温32～33℃にて19日間の2回目の高水温暴露実験を行った。その他の実験方法は1回目と同様であった。

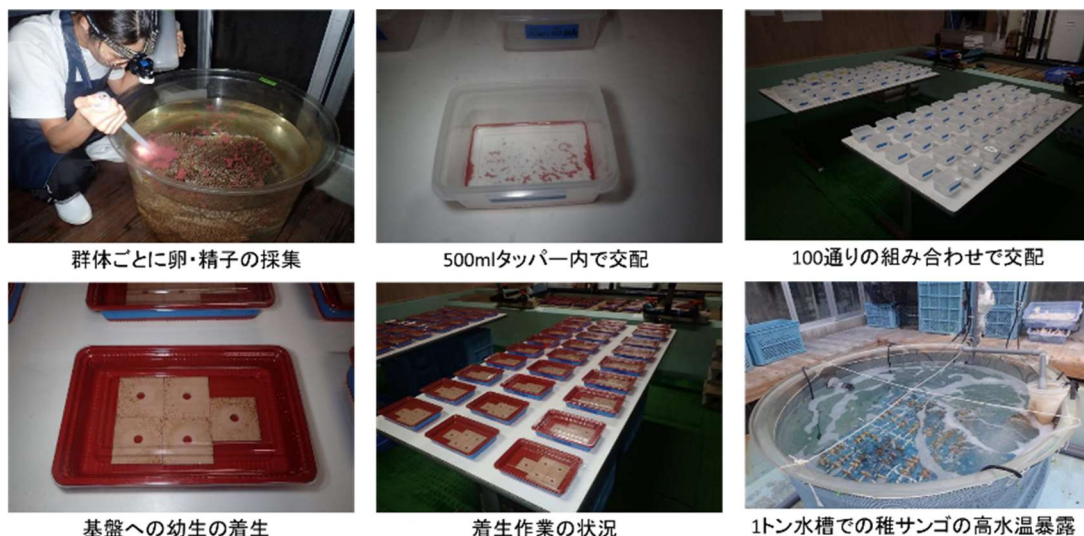


図-IV.8.4 組み合わせ交配稚サンゴの着生および高水温暴露状況

(3) 結果

1) 稚サンゴの生産

着生が観察された組み合わせは 108 通り中 49 通りであり、生産した稚サンゴ数は合計で 487 群体であった。平均着生率は 2.6% で通常の着生率 50% 程度を大きく下回った（表-IV.8.6）。親の高水温耐性に基づいて稚サンゴを以下の 4 つのグループ（ここでは、「組み合わせグループ」と呼ぶ）に分けて、高水温暴露実験での生残率の比較を行うこととした。

- ・高耐性の親由来の卵×高耐性の親由来の精子
- ・高耐性の親由来の卵×低耐性の親由来の精子
- ・低耐性の親由来の卵×高耐性の親由来の精子
- ・低耐性の親由来の卵×低耐性の親由来の精子

表-IV.8.6 各組み合わせ交配における幼生の着生率（上）および着生数（下）

		精子											
群体番号		18-21	18-3	23-3	23-29	23-46	23-31	23-34	22-2	23-15	23-37	23-48	23-35
耐性		高	高	高	超高	超高	高	高	低	低	低	低	低
卵	18-21 高		1%	13%	0%	19%	—	—	1%	7%	0%	0%	3%
	18-3 高	6%		9%	0%	11%	—	—	1%	1%	0%	0%	2%
	23-3 高	0%	0%		0%	0%	—	—	0%	2%	3%	0%	0%
	23-29 超高	20%	5%	2%		0%	—	—	—	0%	9%	0%	0%
	23-46 超高	0%	7%	5%	2%		—	—	0%	3%	6%	0%	5%
	23-31 高	—	—	—	—	—		—	—	—	—	0%	0%
	23-34 高	—	—	—	—	—	—		—	—	—	5%	1%
	22-2 低	0%	0%	0%	0%	0%	—	—		—	—	0%	0%
	23-15 低	9%	0%	13%	24%	6%	—	—	4%		—	6%	2%
	23-37 低	0%	—	0%	5%	0%	—	—	0%	—		—	0%
	23-48 低	0%	0%	18%	11%	0%	1%	0%	13%	0%	0%		—
	23-35 低	0%	3%	7%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	

		精子											
群体番号		18-21	18-3	23-3	23-29	23-46	23-31	23-34	22-2	23-15	23-37	23-48	23-35
耐性		高	高	高	超高	超高	高	高	低	低	低	低	低
卵	18-21 高		4	31	1	55	—	—	3	20	0	0	8
	18-3 高	18		11	0	12	—	—	1	2	0	0	7
	23-3 高	0	0		0	1	—	—	0	7	8	0	0
	23-29 超高	10	2	7		0	—	—	0	0	27	0	1
	23-46 超高	0	6	4	2		—	—	0	1	4	0	6
	23-31 高	—	—	—	—	—		1	—	—	—	0	0
	23-34 高	—	—	—	—	—	1		—	—	—	14	4
	22-2 低	0	0	0	0	0	—	—		0	0	0	0
	23-15 低	26	0	32	10	1	—	—	12		17	5	3
	23-37 低	0	0	0	16	0	—	—	0	0		0	1
	23-48 低	0	0	15	9	0	2	0	40	1	0		16
	23-35 低	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	

組み合わせグループ	個体数
卵(高)×精子(高)	166
卵(低)×精子(低)	95
卵(高)×精子(低)	113
卵(低)×精子(高)	113
合計	487

通常の場合、着床着はあらかじめ海域に 1 か月間ほど浸漬し、サンゴ幼生の着生を誘引するバクテリアを着床具の表面に付着させる必要がある。今回も同様に 1 か月間海域に着床具を浸漬したが、海域から回収後に水槽に 1 週間収容した。このため、バクテリア叢が変化し着生誘引バクテリアが減少したことにより、着生が異常に低くなった可能



図-IV.8.5 着床具を 1 週間収容した水槽

性が考えられる（図-IV.8.5）。幼生の着生を行う際には、着生を行う当日に海域より着床具を引き上げて使用することが必要であることを再認識した。

2) 稚サング高水温暴露実験

1 回目の稚サング高水温暴露実験の結果を、親の高水温耐性の表現型に基づいてグループ分けしたものを表-IV.8.7 に示す（高水温耐性の表現型とは、高水温暴露実験で明らかとなった高水温への耐性のことで、高水温で異常なし=高耐性、高水温で白化・斃死=低耐性）。いずれの組み合わせグループ間でも、生残率の違いは見られなかった。

表-IV.8.7 1 回目稚サングの高水温暴露の結果（上：実験開始時、下：実験終了時）
《親の高水温耐性（表現型）に基づいてグループ分け》

初期群体数 2024/7/25

			精子											
群体番号			18-21	18-3	23-3	23-29	23-46	23-31	23-34	22-2	23-15	23-37	23-48	23-35
	耐性	SNP型	高	高	高	超高	超高	高	高	低	低	低	低	低
卵	18-21	高 T/T, T/T, A/A, T/T		4	31	1	55	-	-	3	20	-	-	8
	18-3	高 C/C, C/C, C/C, C/C	18		11	-	12	-	-	1	2	-	-	7
	23-3	高 T/T, T/T, A/A, T/T	-	-		-	1	-	-	-	7	8	-	-
	23-29	超高 C/C, G/G, C/C, C/C	10	2	7		-	-	-	-	-	27	-	1
	23-46	超高 C/C, G/G, C/C, C/C	-	6	4	2		-	-	-	1	4	-	6
	23-31	高 T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	-	-		1	-	-	-	-	-
	23-34	高 C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	-	-	-	1		-	-	-	14	4
	22-2	低 C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
	23-15	低 C/C, G/G, C/C, C/C	26	-	32	10	1	-	-	12		17	5	4
	23-37	低 T/T, T/T, A/A, T/T	-	-		16	-	-	-	-	-			1
	23-48	低 T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	15	9	-	2		40	1	-		16
	23-35	低 C/C, G/G, C/C, C/C	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	

2024/9/11の生残群体数

			精子											
群体番号			18-21	18-3	23-3	23-29	23-46	23-31	23-34	22-2	23-15	23-37	23-48	23-35
	耐性	SNP型	高	高	高	超高	超高	高	高	低	低	低	低	低
卵	18-21	高 T/T, T/T, A/A, T/T		3	28	1	49	-	-	3	17	-	-	8
	18-3	高 C/C, C/C, C/C, C/C	18		10	-	10	-	-	1	2	-	-	5
	23-3	高 T/T, T/T, A/A, T/T	-	-		-	0	-	-	-	5	8	-	-
	23-29	超高 C/C, G/G, C/C, C/C	7	1	4		-	-	-	-	-	24	-	1
	23-46	超高 C/C, G/G, C/C, C/C	-	5	2	2		-	-	-	1	4	-	6
	23-31	高 T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	-	-		1	-	-	-	-	-
	23-34	高 C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	-	-	-	1		-	-	-	13	2
	22-2	低 C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
	23-15	低 C/C, G/G, C/C, C/C	20	-	31	10	1	-	-	8		15	4	4
	23-37	低 T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	11	-	-	-	-	-		-	1
	23-48	低 T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	12	8	-	1	-	38	1	-		12
	23-35	低 C/C, G/G, C/C, C/C	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	

組み合わせグループ	群体数		生残率
	7/25	9/11	
卵(高)×精子(高)	166	142	86%
卵(高)×精子(低)	113	100	88%
卵(低)×精子(高)	113	96	85%
卵(低)×精子(低)	96	83	86%
合計	488	421	86%

1 回目の稚サング高水温暴露実験の結果を、親の高水温耐性の遺伝型でグループ分けしたものを表-IV.8.8に示す(遺伝型によるグループとは、高水温耐性DNA マーカーである TTAT ホモの遺伝的特徴を両親とも持つ稚サングを TTAT ホモ、片方の親が TTAT ホモの場合の稚サングを TTAT ヘテロ、それ以外の稚サングを TTAT 以外として分けたもの)。いずれの組み合わせグループ間でも、生残率の違いは見られなかった。

表-IV.8.8 1 回目稚サングの高水温暴露の結果（上：実験開始時、下：実験終了時）
《親の遺伝型（SNP 型）に基づいてグループ分け》

初期群体数 2024/7/25

			精子											
群体番号			18-21	23-3	23-31	23-37	23-48	18-3	23-29	23-46	23-34	22-2	23-15	23-35
耐性	SNP型		高	高	高	低	低	高	超高	超高	高	低	低	低
18-21	高	T/T, T/T, A/A, T/T	-	31	-	-	-	4	1	55	-	3	20	8
23-3	高	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	8	-	-	-	1	-	-	7	-
23-31	高	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
23-37	低	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	1
23-48	低	T/T, T/T, A/A, T/T	-	15	2	-	-	-	9	-	-	40	1	16
18-3	高	C/C, C/C, C/C, C/C	18	11	-	-	-	-	-	12	-	1	2	7
23-29	超高	C/C, G/G, C/C, C/C	10	7	-	27	-	2	-	-	-	-	-	1
23-46	超高	C/C, G/G, C/C, C/C	-	4	-	4	-	6	2	-	-	-	1	6
23-34	高	C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	1	-	14	-	-	-	-	-	-	4
22-2	低	C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23-15	低	C/C, G/G, C/C, C/C	26	32	-	17	5	-	10	1	-	12	-	4
23-35	低	C/C, G/G, C/C, C/C	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-

2024/9/11の生残群体数

			精子											
群体番号			18-21	23-3	23-31	23-37	23-48	18-3	23-29	23-46	23-34	22-2	23-15	23-35
耐性	SNP型		高	高	高	低	低	高	超高	超高	高	低	低	低
18-21	高	T/T, T/T, A/A, T/T	-	28	-	-	-	3	1	49	-	3	17	8
23-3	高	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	8	-	-	-	0	-	-	5	-
23-31	高	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
23-37	低	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	1
23-48	低	T/T, T/T, A/A, T/T	-	12	1	-	-	-	8	-	-	38	1	12
18-3	高	C/C, C/C, C/C, C/C	18	10	-	-	-	-	-	10	-	1	2	5
23-29	超高	C/C, G/G, C/C, C/C	7	4	-	24	-	1	-	-	-	-	-	1
23-46	超高	C/C, G/G, C/C, C/C	-	2	-	4	-	5	2	-	-	-	1	6
23-34	高	C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	1	-	13	-	-	-	-	-	-	2
22-2	低	C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23-15	低	C/C, G/G, C/C, C/C	20	31	-	15	4	-	10	1	-	8	-	4
23-35	低	C/C, G/G, C/C, C/C	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-

組み合わせグループ	群体数		生残率
	7/25	9/11	
TTATホモ	56	49	88%
TTAT(卵)ヘテロ	183	158	86%
TTAT(精子)ヘテロ	177	154	87%
TTAT以外	72	60	83%
合計	488	421	86%

2回目の稚サング高水温暴露実験の結果を、親の高水温耐性の表現型に基づいてグループ分けしたものを表-IV.8.9に示す。生残率は、「卵(高耐性の親)×精子(高耐性の親)」の稚サングにおいて最も高く、「卵(低耐性の親)×精子(低耐性の親)」の稚サングで最も低かった。「卵(高耐性の親)×精子(低耐性の親)」および「卵(低耐性の親)×精子(高耐性の親)」の稚サングは、前者の中間の生残率であった。このことから、親の高水温耐性が子にも引き継がれている可能性があることが分かった。しかし、下段の表の上3つのグループ間では差が小さく、明確に高水温耐性が世代間で引き継がれたと断言することは難しいかもしれない

表-IV.8.9 2回目稚サングの高水温暴露の結果（上：実験開始時、下：実験終了時）
《親の高水温耐性（表現型）に基づいてグループ分け》

初期群体数 2024/12/27

			精子											
卵	群体番号		18-21	18-3	23-3	23-29	23-46	23-31	23-34	22-2	23-15	23-37	23-48	23-35
	耐性	SNP型	高	高	高	超高	超高	高	高	低	低	低	低	低
卵	18-21	高	T/T, T/T, A/A, T/T	3	16	1	29	-	-	1	17	-	-	7
	18-3	高	C/C, C/C, C/C, C/C	16	10	-	12	-	-	1	1	-	-	4
	23-3	高	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	0	-	-	-	5	8	-	-
	23-29	超高	C/C, G/G, C/C, C/C	8	1	3	-	-	-	-	-	19	-	1
	23-46	超高	C/C, G/G, C/C, C/C	-	4	2	2	-	-	-	1	3	-	5
	23-31	高	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	23-34	高	C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	-	-	1	-	-	-	-	11	2
	22-2	低	C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23-15	低	C/C, G/G, C/C, C/C	18	-	25	8	1	-	8	-	14	4	5
	23-37	低	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	1
	23-48	低	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	10	8	-	1	-	38	1	-	10
	23-35	低	C/C, G/G, C/C, C/C	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-

2025/2/20の生残群体数

			精子											
卵	群体番号		18-21	18-3	23-3	23-29	23-46	23-31	23-34	22-2	23-15	23-37	23-48	23-35
	耐性	SNP型	高	高	高	超高	超高	高	高	低	低	低	低	低
卵	18-21	高	T/T, T/T, A/A, T/T	3	16	0	27			1	11			7
	18-3	高	C/C, C/C, C/C, C/C	15	10		11			1	1			4
	23-3	高	T/T, T/T, A/A, T/T				0				2	6		
	23-29	超高	C/C, G/G, C/C, C/C	8	1	1						17		1
	23-46	超高	C/C, G/G, C/C, C/C		4	2	1				0	2		0
	23-31	高	T/T, T/T, A/A, T/T						0					
	23-34	高	C/C, G/G, C/C, C/C					1					9	1
	22-2	低	C/C, G/G, C/C, C/C											
	23-15	低	C/C, G/G, C/C, C/C	17		21	7	1		5		9	1	5
	23-37	低	T/T, T/T, A/A, T/T				10							1
	23-48	低	T/T, T/T, A/A, T/T			9	8		1	17	1			6
	23-35	低	C/C, G/G, C/C, C/C		1	1								

組み合わせグループ	1/3		2/20	
	群体数	生残率	群体数	生残率
卵(高)×精子(高)	109	100%	100	92%
卵(高)×精子(低)	86	100%	63	73%
卵(低)×精子(高)	85	100%	76	89%
卵(低)×精子(低)	81	100%	45	56%
合計	361		284	

2 回目の稚サング高水温暴露実験の結果を、親の高水温耐性の遺伝型に基づいてグループ分けしたものを表-IV.8.10 に示す。生残率は、「両親とも TTAT ホモ」の稚サングにおいて最も高くなったことから、遺伝型から見ても、親の高水温耐性が子にも引き継がれている可能性があることが分かった。しかし、「両親とも TTAT ホモ」の稚サングと他のグループ間の差は小さく、ここでも明確に高水温耐性が世代間で引き継がれたと断言することは難しいかもしれない

表-IV.8.10 2 回目稚サングの高水温暴露の結果（上：実験開始時、下：実験終了時）
《親の遺伝型（SNP 型）に基づいてグループ分け》

初期群体数 2024/12/27

			精子												
群体番号			18-21	23-3	23-31	23-37	23-48	18-3	23-29	23-46	23-34	22-2	23-15	23-35	
	耐性	SNP型	高	高	高	低	低	高	超高	超高	高	低	低	低	
卵	18-21	高	T/T, T/T, A/A, T/T		16	-	-	-	3	1	29	-	1	17	7
	23-3	高	T/T, T/T, A/A, T/T	-		-	8	-	-	0	-	-	5		
	23-31	高	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-		-	-	-	-	1	-	-	-	
	23-37	低	T/T, T/T, A/A, T/T	-	-	-		-	12	-	-	-	-	1	
	23-48	低	T/T, T/T, A/A, T/T	-	10	1	-	-	8	-	-	38	1	10	
	18-3	高	C/C, C/C, C/C, C/C	16	10	-	-	-	-	12	-	1	1	4	
	23-29	超高	C/C, G/G, C/C, C/C	8	3	-	19	-	1	-	-	-	-	1	
	23-46	超高	C/C, G/G, C/C, C/C	-	2	-	3	-	4	2		-	-	1	5
	23-34	高	C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	1	-	11	-	-	-	-	-	-	2
	22-2	低	C/C, G/G, C/C, C/C	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	
	23-15	低	C/C, G/G, C/C, C/C	18	25	-	14	4	-	8	1	-	8		5
	23-35	低	C/C, G/G, C/C, C/C	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	

2025/2/20の健全群体数

群体番号			精子											
			18-21	23-3	23-31	23-37	23-48	18-3	23-29	23-46	23-34	22-2	23-15	23-35
卵	耐性	SNP型	高	高	高	低	低	高	超高	超高	高	低	低	低
	18-21	高	T/T, T/T, A/A, T/T		16			3	0	27		1	11	7
	23-3	高	T/T, T/T, A/A, T/T				6			0			2	
	23-31	高	T/T, T/T, A/A, T/T								0			
	23-37	低	T/T, T/T, A/A, T/T						10					1
	23-48	低	T/T, T/T, A/A, T/T		9	1			8			17	1	6
	18-3	高	C/C, C/C, C/C, C/C	15	10					11		1	1	4
	23-29	超高	C/C, G/G, C/C, C/C	8	1		17	1						1
	23-46	超高	C/C, G/G, C/C, C/C		2		2	4	1				0	0
	23-34	高	C/C, G/G, C/C, C/C			1		9						1
	22-2	低	C/C, G/G, C/C, C/C											
	23-15	低	C/C, G/G, C/C, C/C	17	21		9	1	7	1		5		5
	23-35	低	C/C, G/G, C/C, C/C		1			1						

組み合わせグループ	1/3		2/20	
	群体数	生残率	群体数	生残率
TTATホモ	35	100%	32	91%
TTAT(卵)ヘテロ	134	100%	94	70%
TTAT(精子)ヘテロ	135	100%	114	84%
TTAT以外	57	100%	44	77%
合計	361		284	

(4) まとめ

今年度においては、「組み合わせ交配サンゴ」の組み合わせ数を過年度の実験より増やしたことによって、過年度とは異なり、高水温耐性を持つ親から生産した稚サンゴも高水温耐性を持つ可能性があることが示された。ただし、今年度の種苗生産において幼生の着生率が異常に低く、稚サンゴを確保できなかった組み合わせが多数あった。また、着生が非常に少ない（1～数群体）の組み合わせも多く、適正な実験のために十分な稚サンゴ数が確保できないと言いき難い。

来年度において適正な実験を行うためには、少なくとも 90 通りの組み合わせ（高耐性の親 5 群体、低耐性の親 5 群体由来の卵と精子を組み合わせる）において、十分な稚サンゴの群体数（各組み合わせにおいて 50 群体程度）を確保して高水温暴露実験を行う必要があると考えられる。

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.
- Shinzato C, Khalturin K, Inoue J, Zayasu Y, Kanda M, Kawamitsu M, Yoshioka Y, Yamashita H, Suzuki G, Satoh N (2021) Eighteen coral genomes reveal the evolutionary origin of *Acropora* strategies to accommodate environmental changes. *Molecular biology and evolution*, 38.1, 16-30
- 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