

Ⅳ-6. 高温耐性型サンゴの種苗生産技術の開発

目 次

IV. 6. 高温耐性型サンゴの種苗生産技術の開発

1. はじめに	IV-6-1
2. 技術開発の概要	IV-6-1
3. 高水温耐性 DNA マーカーの開発	IV-6-3
3.1. 過年度の成果	IV-6-3
3.2. 今年度の成果	IV-6-5
(1) 目的	IV-6-5
(2) 方法	IV-6-5
(3) 結果	IV-6-5
(4) 考察と今後の展望	IV-6-10
4. 高水温耐性の次世代への遺伝的継承の検証	IV-6-11
4.1. 過年度の成果	IV-6-11
4.2. 今年度の成果	IV-6-12
(1) 目的	IV-6-12
(2) 方法	IV-6-12
(3) 結果と考察	IV-6-13
5. 引用文献	IV-6-15

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)。本研究では、以下の 2 つの手法において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、2018 年に技術開発を開始した。

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)

②従来の育種法 (選抜育種)

選抜育種については、0 歳令で高水温選抜したサンゴは 4 歳令の成体になるまで高水温耐性を維持しているという結果が得られた。このため、高水温耐性を持つサンゴの選抜育種による種苗生産技術が開発できたとして、2023 年度までに研究を完了している。

2. 技術開発の概要

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により生産する方法である。本技術開発では、高水温耐性が遺伝によるものであることを確認するとともに、高水温耐性に関する DNA の特徴を見つけるために、以下の 3 つの実験・研究を実施した (図・IV.6.1)。

- ・ 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 の比較および高水温耐性 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.6.2)
- ・ 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。

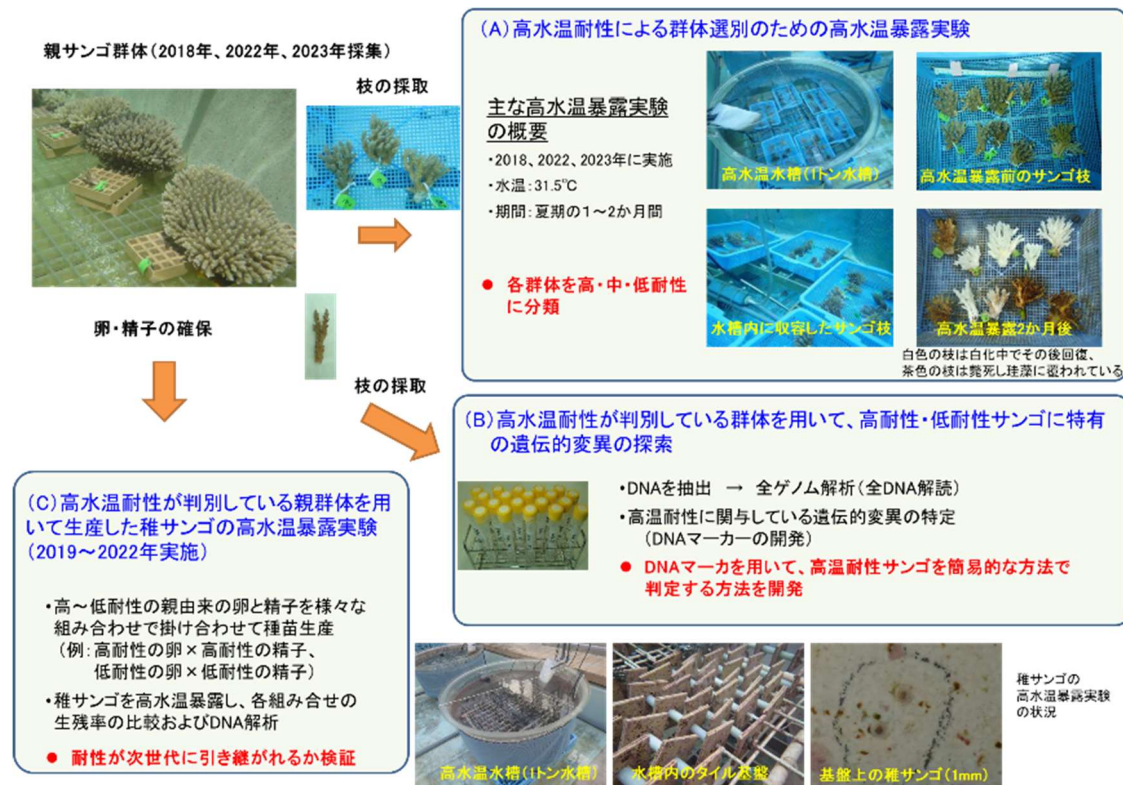


図-IV. 6. 1 DNA マーカー開発のための実験の流れ

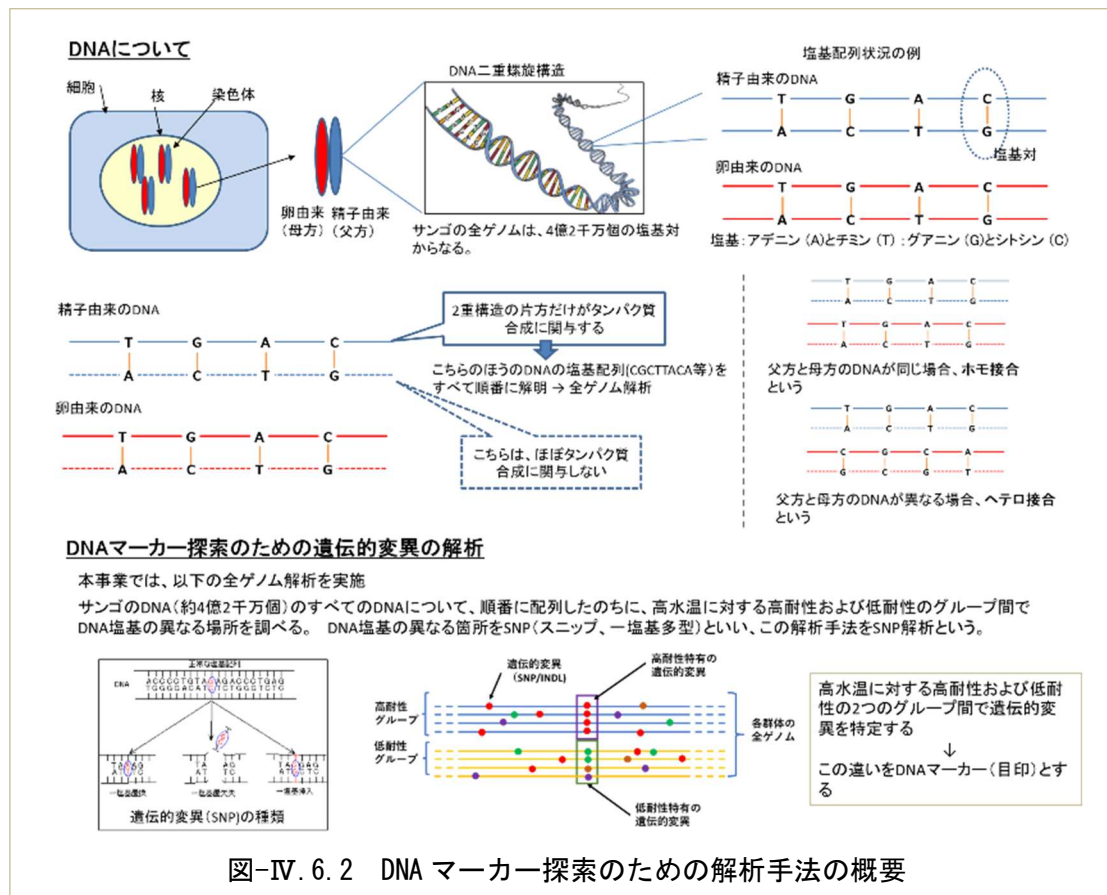


図-IV. 6. 2 DNA マーカー探索のための解析手法の概要

3. 高水温耐性 DNA マーカーの開発

3.1. 過年度の成果

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.6.1）。

表-IV.6.1 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 回繰り返す、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.6.2 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. 6. 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] 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)を持つ稚サング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) ・高水温耐性 DNA マーカー(TTAT ホモ)が正しくない	・目的の領域だけを増幅するために、プライマーの改善 ・改善後のプライマーにて PCR を実施し、不都合な結果が生じないか検証 ・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

2024 年度においては、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(図-IV.6.3) (この 2 段階で PCR を行う手法は Nested PCR と呼ばれる)。その結果、Nested PCR を行うことで親子の遺伝型が一致し、当該 SNP 箇所を PCR で正しく増幅する技術の目途がついた。今後は、DNA マーカー候補(TTAT ホモ)が本当に高水温耐性マーカーとして有効であるか検証を行うこととした。

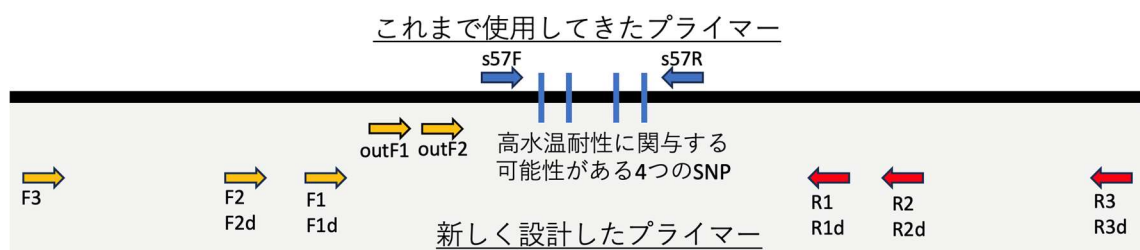


図-IV. 6. 3 高水温耐性に関与する可能性のある 4 箇所の SNP が位置するゲノム領域と設計したプライマーのゲノム上の位置関係

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) を上に示し、新規で作成したプライマーを下図網掛けで示す。Fw プライマーを黄色、Rv プライマーを赤で表示している。

3.2. 今年度の成果

(1) 目的

本年度は Nested PCR 法を用いて、これまでの高水温曝露実験等に使用した群体を再解析し、遺伝子型 (SNP タイプ) の再確認と、その結果に基づいた高水温耐性との関連についての再検討を行った。

(2) 方法

Nested PCR は、2024 年度報告書に記載されている手法により行った。これまでの本事業において SNP 型を特定したものと同じウスエダミドリイシの DNA サンプルを用いて実験を行った。再解析を行ったサンプルは以下の通りである。

- ・ B サンプル：2022 年度に種苗生産と高水温曝露を行った久米島産群体。
- ・ R サンプル：TTAT のホモを持つと判定された親群体を掛け合わせた稚サンゴ。卵 B4-精子 K21、卵 B10-精子 K21、卵 K21-精子 B10 をかけ合わせている。
- ・ M サンプル：2019 年に沖ノ島産の親群体から有性生殖で生産され、高水温曝露実験後に生残した種苗。
- ・ Q サンプル：2023 年に久米島で採捕し、高水温曝露実験に使用した 50 群体。
- ・ 2019, 2020, 2022 年に実施された稚サンゴの高水温曝露実験で、稚サンゴの作成に使用された親群体。

Nested PCR の 1st PCR で増幅されないサンプルがいくつか確認されたが、全て TTAT ホモ以外と判定された群体であったため、Nested PCR で増幅されなかった場合は TTAT ホモではない、と判断した。

(3) 結果

1) 3.1. B サンプル：2022 年度に種苗生産と高水温曝露を行った久米島産群体

Nested PCR を行っても、SNP 型の結果は変わらなかった (SNP 型は 2024 年度報告書別紙を参照)。22 群体中 TTAT ホモと判定されたのは 6 群体で、そのうち高水温耐性とされたのは 1 群体だけだった。この結果からは、TTAT ホモと高水温耐性に関係があるとは言えない。

2) R サンプル:TTAT のホモを持つと判定された親群体を掛け合わせた稚サンゴ(表-IV.6.3)

TTAT ホモと判定された群体同士のかけ合わせの稚サンゴが、TTAT ホモの SNP 型を持つのかを確認するために実施した。2024 年度の結果では、20 群体中 2 群体が TTAT ホモという結果だったが、Nested PCR により卵 B4-精子 K21 のかけ合わせだと 7/20、卵 B10-精

子 K21 のかけ合わせだと 10/20、卵 K21-精子 B10 のかけ合わせだと 11/20 が TTAT ホモと判定された。理論上全ての稚サングが TTAT ホモになるはずだが、ならなかった。

表-IV. 6. 3 R サンプルの Nested PCR によって特定した SNP 型と以前の SNP 型との比較
TTAT ホモは赤文字、TTAT に変わった群体は黄色塗、Nested PCR により増幅されず、TTAT ホモでないと判定された群体は灰色塗で示す。

サンプル名	Nested PCRによるSNP型				以前のSNP型				
R1	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	卵B4-精子K21
R2	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R3	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	T/T	
R4	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	
R5	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R6					C/C	C/C	C/C	C/C	
R7	T/C	T/G	A/C	T/C	T/C	G/T	A/C	T/C	
R8	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	
R9					C/C	C/C	C/C	C/C	
R10	T/C	G/T	A/C	T/C	T/C	G/T	A/C	T/C	
R11	T/C	T/G	A/C	T/T	T/C	T/G	A/C	T/C	
R12	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R13	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	
R14	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	
R15	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	
R16	T/T	T/G	A/C	T/T	T/C	G/T	A/C	T/C	
R17	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	
R18					C/C	C/C	C/C	C/C	
R19	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	卵B10-精子K21
R20	T/T	T/G	A/A	T/T	T/C	G/T	A/C	T/C	
R21	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R22	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	
R23	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R24	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R25	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	
R26	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	
R27	T/T	T/G	A/A	T/T	T/C	T/G	A/C	T/C	
R28	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	
R29	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R30	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R31	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R32	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R33	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	
R34	T/T	T/T	A/A	T/T	T/C	T/G	A/C	T/C	
R35	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	卵K21-精子B10
R36	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	
R37	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/G	A/C	T/T	
R38	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R39	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R40	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	
R41	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R42	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	
R43	T/T	T/T	A/A	T/T	T/C	T/G	A/C	T/T	
R44	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/G	A/C	T/T	
R45	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R46	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	
R47	T/T	T/T	A/A	T/T	T/C	G/T	A/C	T/T	
R48	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R49	T/T	T/T	A/A	T/T	T/C	G/T	A/C	T/C	
R50	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R51	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	
R52	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	
R53	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R54	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R55	T/T	T/T	A/A	T/T	T/C	G/T	A/C	T/C	
R56	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	
R57	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R58	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R59	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	
R60	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	

3) M サンプル：2019 年に沖ノ鳥島産の親群体から有性生殖で生産され、
高水温暴露実験後に生残した種苗（表-IV.6.4）

Nested PCR の結果、2 群体が追加され、50 群体中 32 群体が TTAT ホモと判定された。2022 年に実施した高水温暴露前のランダム採集した 50 群体の SNP 型確認では、50 群体中 35 群体が TTAT ホモと判定されていた。暴露後は 32/50 群体が TTAT ホモとなり、高水温暴露で TTAT 群体が選抜されたとは結論付けられない。

一方で、高水温暴露後に生残した TTAT ホモ 32 群体中、継続飼育時に白化や病気になったものは 1 群体のみだった。全体では 50 群体中 17 群体が白化もしくは病気罹患したとのことで、TTAT 以外の 18 群体中 16 群体が白化もしくは病気に罹患したことになる。白化もしくは病気罹患について TTAT ホモとそれ以外の群体を Fisher の正確検定とカイ二乗検定で比較すると有意に異なるという結果になり（ $p < 0.01$ ）、TTAT ホモを持つ群体は白化や病気になりにくい可能性がある。

表-IV.6.4
M サンプルの Nested PCR によって特定した SNP 型と以前の SNP 型との比較

TTAT ホモは赤文字、TTAT に変わった群体は黄色塗、Nested PCR により増幅されず、TTAT ホモでないと判定された群体は灰色塗で示す。

サンプル名	Nested PCR による SNP 型				以前の SNP 型				病気白化の経験の有無
M1	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M2	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M3	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M4	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M5	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M6	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M7	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M8	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M9	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M10	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M11	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M12	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M13	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M14	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	有
M15					C/C	G/G	C/C	C/C	
M16	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M17	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M18	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M19	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M20					C/C	G/G	C/C	C/C	有
M21	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M22	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M23	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M24	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M25	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M26					C/C	G/G	C/C	C/C	有
M27	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M28	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	有
M29	T/T	T/T	A/A	T/T	T/C	G/T	A/C	T/T	
M30	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	有
M31					C/C	G/G	C/C	C/C	有
M32	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	有
M33					C/C	G/G	C/C	C/C	有
M34	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M35					C/C	G/G	C/C	C/C	有
M36					C/C	G/G	C/C	C/C	有
M37					C/C	G/G	C/C	C/C	有
M38					C/C	G/G	C/C	C/C	有
M39					C/C	G/G	C/C	C/C	有
M40					C/C	G/G	C/C	C/C	有
M41	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	有
M42	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	有
M43	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M44	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M45	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M46	C/C	G/G	C/C	C/T	C/C	G/G	C/C	C/C	有
M47	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M48	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無
M49	C/T	G/G	C/C	C/T	C/T	G/T	C/A	C/T	
M50	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	無

4) Q サンプル：2023 年に久米島で採捕し、高水温暴露実験に使用した 50 群体 (表-IV.6.5)

久米島の北東部沿岸と島尻湾で天然のウスエダミドリイシをそれぞれ 25 群体採捕し、高水温暴露実験を行っている。各群体の白化程度は、①変化なし、②全体的に薄くなる、③先端や群体の一部が白化、④全体が白化、⑤発病、⑥斃死の 6 段階で分類された。Nested PCR の結果、3 群体が新たに、1 群体が TTAI 以外と判定され、合計 15 群体が TTAT ホモと判定された。採捕地点ごとと、両地点を合計して解析した結果を以下に記す。

- ・ 北東部沿岸採捕群体：全体では、上記白化程度 1 が 4 群体, 2 が 3 群体, 3 が 1 群体, 4 が 1 群体, 6 が 16 群体であった。6 群体が TTAT ホモと判定され、1 が 2 群体 (33%)、2 が 1 群体, 6 が 3 群体であった。TTAT 以外と判定された群体は 19 群体で、1 が 2 群体(11%), 2 が 2 群体, 3 が 1 群体、4 が 1 群体、6 が 13 群体であった。TTAT とそれ以外で 1 (高水温曝露で白化無し) と分類された割合は、Fisher's exact test で有意差は出なかった。
- ・ 島尻湾：全体では、白化程度 1 が 18 群体, 2 が 2 群体, 4 が 1 群体, 6 が 4 群体であった。TTAT ホモと判定されたのは 9 群体で、1 が 6 群体 (66%) , 4 が 1 群体, 6 が 2 群体であった。TTAT 以外は 16 群体で、1 が 12 群体 (75%)、2 が 2 群体, 6 が 2 群体であった。TTAT とそれ以外で 1(高水温曝露で白化無し) と分類された割合は、Fisher's exact test で有意差は出なかった。
- ・ 両方合計 (50 群体) : TTAT ホモ群体で白化程度 1 が 8 群体、それ以外の白化程度だったのが 7 群体であった (53%)。TTAT ホモ以外だと、1 が 14 群体、それ以外の白化程度は 2 1 群体 (40%) であった。TTAT ホモであるかを区別せず、北東部沿岸と島尻湾で、白化程度 1 とそれ以外の白化程度の群体を比較すると Fisher's exact test で $p = 0.0001$ と有意差があるということになり、高水温耐性に地域差が確認された。TTAT 以外の 35 群体で北東部沿岸と島尻湾を比較すると、Fisher's exact test で $p = 0.0001$ (2, 17 と 12, 4) と有意差出るので、TTAT 以外の群体でも高水温耐性に地域差があった。一方 TTAT ホモの群体においては Fisher の正確検定で地域差の有意差は確認されず、高水温耐性に地域差は確認されなかった。実験期間中全く白化しなかった超高水温耐性群体は Q29 と Q46 の 2 群体で、どちらも TTAT ホモと判定されなかった。

表-IV.6.5 Q サンプルの Nested PCR によって特定した SNP 型と以前の SNP 型との比較
TTAT ホモは赤文字、TTAT に変わった群体は黄色塗、Nested PCR により増幅されず、TTAT ホモ
でない判定された群体は灰色塗で示す。

サンプル名	Nested PCRによるSNP型				以前のSNP型				6段階の白化の状況	
Q1					C/C	G/G	C/C	C/C	6	北東部 沿岸
Q2					C/C	C/C	C/C	C/C	6	
Q3	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	1	
Q4					C/C	C/C	C/C	C/C	2	
Q5					C/C	C/C	C/C	C/C	6	
Q6					C/C	C/C	C/C	C/C	6	
Q7					C/C	C/C	C/C	C/C	1	
Q8	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	6	
Q9					C/C	C/C	C/C	C/C	6	
Q10	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	2	
Q11					C/C	G/G	C/C	C/C	2	
Q12					C/C	C/C	C/C	C/C	6	
Q13	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	6	
Q14					C/C	G/G	C/C	C/C	1	
Q15	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	6	
Q16					C/C	G/G	C/C	C/C	6	
Q17	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	6	
Q18					C/C	G/G	C/C	C/C	6	
Q19	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	6	
Q20					C/C	C/C	C/C	C/C	6	
Q21	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	3	
Q22	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	1	
Q23	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	6	
Q24					C/T	G/G	C/C	C/T	4	
Q25					C/C	C/C	C/C	C/C	6	
Q26					T/C	G/T	C/A	T/C	1	島尻湾
Q27	C/C	G/G	C/A	C/C	T/T	T/T	A/A	T/T	1	
Q28					C/C	G/G	C/C	C/C	1	
Q29	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	1	
Q30					C/C	C/C	C/C	C/C	1	
Q31	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	1	
Q32	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	1	
Q33	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	1	
Q34	C/C	G/G	C/C	C/T	C/C	G/G	C/C	C/C	1	
Q35					C/C	G/G	C/C	C/C	6	
Q36					T/C	G/T	C/A	T/C	2	
Q37	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	6	
Q38	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	1	
Q39	T/C	G/T	C/A	T/C	T/C	G/G	C/A	T/C	2	
Q40					C/C	C/C	C/C	C/C	6	
Q41	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	4	
Q42					C/C	G/G	C/C	C/C	1	
Q43	T/T	T/G	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	1	
Q44	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	1	
Q45					T/C	G/T	C/A	C/T	1	
Q46					C/C	G/G	C/C	C/C	1	
Q47	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	1	
Q48	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	6	
Q49					C/C	G/G	C/C	C/C	1	
Q50	T/T	T/T	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	1	

5) 2019, 2020, 2022 年に実施された稚サングの高水温曝露実験に使用された親群体

Nested PCR を行っても 2019, 2022 年のかけ合わせに使われた群体の TTAT ホモ判別結果は変わらなかったが、2020 年は 1 群体 (K14) が追加で TTAT ホモと判定された。各年代の高水温耐性と TTAT ホモの関係性の解析について記載する。

- ・ 2019 年 : TTAT ホモと判定された親群体のかけ合わせ稚サングの生存数 9, 死滅数は 4 群体だった (生存率 $9/13=69.2\%$)。TTAT ホモ以外の稚サングの生存数は 251, 死滅 406 だった (生存率 $251/657=38.2\%$)。Fisher の正確検定とカイ二乗検定で比較すると $p<0.05$ で有意差が確認され、TTAT ホモの稚サングが高水温曝露実験の生存率が高くなった。
- ・ 2020 年 : TTAT ホモと判定された親群体のかけ合わせ稚サングの生存数 157, 死滅数 143 (生存率 $157/300=52.3\%$) だった。TTAT ホモ以外の稚サングの生存数は 601, 死滅 523 (生存率 $601/1124=53.5\%$)。両者を統計解析で比較すると、Fisher の正確検定とカイ二乗検定ともに有意差は無かった。
- ・ 2022 年 : TTAT ホモと判定された親群体のかけ合わせ稚サングの生存数 50, 死滅数 57 (生存率 $50/107=46.7\%$) で、それ以外は生存 451, 死滅 1408 (生存率 $451/1859=24.3\%$) であった。これらを統計解析すると、Fisher の正確検定で $p<0.001$ 、カイ二乗検定で $p<0.01$ で有意差があり、TTAT ホモの稚サングが高水温曝露実験の生存率が高くなった。

2020 年の実験では差が検出されなかったが、2019 と 2022 年の実験では TTAT ホモ同士のかげ合わせで得られた稚サングは高水温での生存可能が高くなった。TTAT が高水温に関係している可能性が示唆された。

(4) 考察と今後の展望

Nested PCR によって、昨年度までに実施した TTAT ホモの判定結果と大きく変わることはなかったが、それぞれの実験区で TTAT ホモと判定される群体が数個確認された。

かけ合わせの稚サングを用いた実験のみ、TTAT と高水温耐性の関係が統計的に示唆されたが、それ以外では明確な関係性が見られなかった。これらの違いは、統計解析に使用できた群体数の違いが大きく影響したと考えられる。久米島の天然採捕群体を用いた高水温曝露実験 (Q サンプル) の結果を見ると、TTAT ホモが高水温耐性と何らかの関係がある可能性がある。TTAT ホモと高水温耐性の関係をより明確にするには、統計解析に耐えうる数の群体数を用いて実験をすることが重要になると考えられる。

4. 高水温耐性の次世代への遺伝的継承の検証

4.1. 過年度の成果

2019 年度より 2024 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、TTAT ホモの親群体由来の稚サンゴの生残率が、TTAT ホモ以外の親由来の稚サンゴより高い傾向は明確には見らなかった。

^{*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、解決のための今後の研究方針案が策定された（表-IV.6.6）。本年度もこの方針に従って、「組み合わせ交配サンゴ」を用いた高水温暴露実験を行った。

表-IV.6.6 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

4.2. 今年度の成果

(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、本年度も、複数の高耐性および低耐性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

種苗生産および高水温暴露の一連の作業の状況を図-IV.6.4 に示す。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2022年、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2025年5月18、19日、6月19日に放出した卵と精子を群体別に確保し（高耐性8、低耐性7群体）、100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た。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、約33℃の水温で高水温暴露実験を行った。高水温暴露の期間は、5月産卵分については2025年7月17日から51日間、6月産卵分については2025年8月12日から30日間であった。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。



図-IV. 6. 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) 結果と考察

1) 稚サンゴの生産

着生が観察された組み合わせは 100 通り中 85 通りであった。生産した稚サンゴ数は、5 月産卵分が 5,317 群体、6 月産卵分が 336 群体であった。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

2) 稚サンゴ高水温暴露実験

5 月産卵分稚サンゴの高水温暴露実験の結果を図・IV.6.5 に示す。

昨年度、平均水温 32.1℃で 61 日間高水温暴露したところ、すべての組み合わせグループで生残率が 85%以上であったことから、本年は水温を 0.7℃上げて平均水温 32.8 で実験を行った。実験開始 1 か月で、ほぼすべての群体が白化し、45 日目頃より斃死が発生し始めた。その後、急激に斃死する群体が増えたため、51 日目から水温を降温したが大量斃死が発生した。最終的に、常温水温で約 1 か月間養生した後に生残群体の計数を行ったところ、全体の生残率は 1.0%であった。「低耐性の親サンゴ由来の卵と精子を交配したグループ」において生残率が高い結果となったが、各グループにおいて生残率が非常に低いため、結果の信頼度は低いと考えられる。

6 月産卵分稚サンゴの高水温暴露実験の結果を図・IV.6.6 に示す。

約 1 か月間の高水温暴露期間では、組み合わせグループ間で生残率が大きく異なり、「高耐性の親由来の卵と精子を交配したグループ」で最も高い生残率を示した。水温約 33℃において稚サンゴの高水温選抜を行う場合、高水温暴露期間は 1 か月程度が適正と思われる。しかし、6 月産卵分稚サンゴを用いた実験では、用いた親は 3 群体であり、稚サンゴ数も合計で約 300 群体と少ないことから、今回の結果の信頼性は低いと考えられる。

今回の実験で十分な成果が得られなかったため、「水温 DNA マーカー候補の確からしさの検証」および「高水温耐性の親から子への継承の検証」のために、来年度も同様な実験を行ってデータの蓄積を図る必要がある。

今回有意な結果が得られなかった原因は、水温と暴露期間の設定が誤っていたためと考えられる。6 月の実験結果から、水温 33℃で 1 か月間の高水温暴露が適切な実験条件であると思われる。

5月19日産卵分群体数

(高水温暴露開始時。計数日 7月17日)

		精子									
	群体番号	23-31	23-34	18-3	22-13	18-21	23-15	23-20	23-25	23-48	22-2
	耐性	高	高	高	高	高	低	低	低	低	低
卵	23-31	高		57	62	43	79	47		27	52
	23-34	高	54	47	94	68	89	67	27	65	62
	18-3	高	78	73	80	63	81	58	57	62	64
	22-13	高	71	70	72	59	95	69	71	88	70
	18-21	高	75	110		91	62	76	85	106	56
	23-15	低	58	75	100	89	53	89	59	74	31
	23-20	低	42	40	63	62	41	75	42	56	40
	23-25	低			45	59		27		59	
	23-48	低	42	71	113	93	95	88	93	63	84
	22-2	低				63					

(高水温暴露後に約1月間養生。計数日10月2日)

		精子									
	群体番号	23-31	23-34	18-3	22-13	18-21	23-15	23-20	23-25	23-48	22-2
	耐性	高	高	高	高	高	低	低	低	低	低
卵	23-31	高	0	0	0	0	0	0	-	0	0
	23-34	高	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	18-3	高	4	3	0	0	0	2	0	0	0
	22-13	高	1	0	2	0	0	0	0	0	0
	18-21	高	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	23-15	低	1	0	0	0	1	2	5	3	1
	23-20	低	0	0	3	0	2	2	1	0	0
	23-25	低	0	0	0	1	0	-	0	0	-
	23-48	低	1	2	2	1	0	1	1	6	1
	22-2	低	1	0	-	0	0	-	-	0	

5月18日産卵分

(高水温暴露開始時。

計数日7月17日)

		精子		
	群体番号	23-46	23-3	22-2
	耐性	超高	高	低
卵	23-46	超高	66	77
	23-3	高	32	46

(高水温暴露後に約1月間養生。

計数日7月17日)

		精子		
	群体番号	23-46	23-3	22-2
	耐性	超高	高	低
卵	23-46	超高	0	0
	23-3	高	0	0
	22-2	低	-	-

5月産卵分稚サンゴの高水温暴露結果まとめ

組み合わせグループ	群体数		生残率
	7月17日	10月2日	
卵(高)×精子(高)	1,381	11	0.8%
卵(高)×精子(低)	1,738	5	0.3%
卵(低)×精子(高)	1,239	15	1.2%
卵(低)×精子(低)	905	23	2.5%
合計	5,263	54	1.0%

多重比較結果 (Holm法、p値)

	高×高	高×低	低×高
高×高	-	-	-
高×低	0.15	-	1
低×高	0.33	0.02	-
低×低	0.006	1.87x10 ⁻⁶	0.09

図-IV. 6. 5 5月産卵分の稚サンゴの高水温暴露結果

表中の耐性は、親サンゴの高水温耐性を示す(「高」は高耐性、「低」は低耐性、「超高」は高水温下で白化しなかった超高耐性)。

6月19日産卵分群体数（高水温暴露開始時。計数日 8月12日）（高水温暴露後に約1月間養生。計数日：10月2日）

		精子			
	群体番号	23-3	23-29	23-35	
	耐性	高	超高	低	
卵	23-3	高	32	25	
	23-29	超高	44	33	
	23-35	低	37	64	

		精子			
	群体番号	23-3	23-29	23-35	
	耐性	高	超高	低	
卵	23-3	高	26	9	
	23-29	超高	30	11	
	23-35	低	9	15	

6月産卵分稚サンゴの高水温暴露結果まとめ

組み合わせグループ	群体数		生残率
	8月12日	10月2日	
卵(高)×精子(高)	76	56	73.7%
卵(高)×精子(低)	58	20	34.5%
卵(低)×精子(高)	101	25	24.6%
卵(低)×精子(低)	0	0	-
合計	235	101	42.9%

多重比較結果（Holm法、p値）

	高×高	高×低
高×高	-	-
高×低	0.03	-
低×高	2.93×10^{-4}	0.38

図-IV. 6. 6 6月産卵分の稚サンゴの高水温暴露結果

表中の耐性は、親サンゴの高水温耐性を示す（「高」は高耐性、「低」は低耐性、「超高」は高水温下で白化しなかった超高耐性）。

5. 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