

IV-7. 高温耐性型サンゴの種苗生産技術の開発

目 次

IV-7. 高温耐性型サンゴの種苗生産技術の開発

1	はじめに	IV-7-1
2	高水温耐性への遺伝子関与の検証	IV-7-3
2.1	DNA 解析	IV-7-3
2.1.1	DNA マーカーの開発	IV-7-3
	(1) DNA マーカー開発の概要	IV-7-3
	(2) 方法	IV-7-4
	(2) 結果および考察	IV-7-5
	(3) 今後の課題	IV-7-9
2.1.2	高温耐性の遺伝的特徴の次世代への継承に関する確認	IV-7-9
	(1) 方法	IV-7-9
	(2) 結果	IV-7-9
2.2	0 歳令稚サンゴの高水温飼育実験	IV-7-10
	(1) 方法	IV-7-10
	(2) 結果および考察	IV-7-10
2.3	2 歳令高水温耐性サンゴの耐性維持および海域環境への適応	IV-7-12
	(1) 方法	IV-7-12
	(2) 結果および考察	IV-7-13
3	従来の手法による高水温耐性サンゴの育種	IV-7-15
3.1	高水温耐性サンゴの飼育環境の把握	IV-7-15
	(1) これまでの経緯	IV-7-15
	(2) 方法	IV-7-15
	(3) 結果および考察	IV-7-16
3.2	今年度の高水温暴露選抜	IV-7-16
	(1) これまでの経緯	IV-7-16
	(2) 方法	IV-7-16
	(3) 結果および今後の予定	IV-7-16
4	引用文献	IV-7-17

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従来の育種法について技術開発を行っている。

① DAN マーカー育種 (図・IV.7.1)

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。

- ・ 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
- ・ 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。

その結果、これまでのところ、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。本年度は、この DNA マーカーの候補が DNA マーカーとして確実に使用できるかどうか検証を行うために遺伝学的研究を実施した。

一方、「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。その原因は、①過酸化水素誘発により配偶子を得たため、稚サンゴの生残に影響が生じたと考えられること、②群体によって産卵日が異なったため、目的とした組み合わせの稚サンゴ（特に高耐性×高耐性の稚サンゴ）が十分に得られず、これらの稚サンゴの高水温暴露実験が実施できていないことである。本年度も過年度に引き続き、目的とする「組み合わせ交配サンゴ」の種苗生産と、これを用いた高水温暴露実験を試みた。

過年度において、2019年に種苗生産した「組み合わせ交配サンゴ」を用いて0歳齢で高水温に暴露し高耐性群体を選別し、またその後1歳齢でも高水温に暴露して高耐性の維持を確認したが、今年度においても、これらの群体を高水温に暴露して2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。

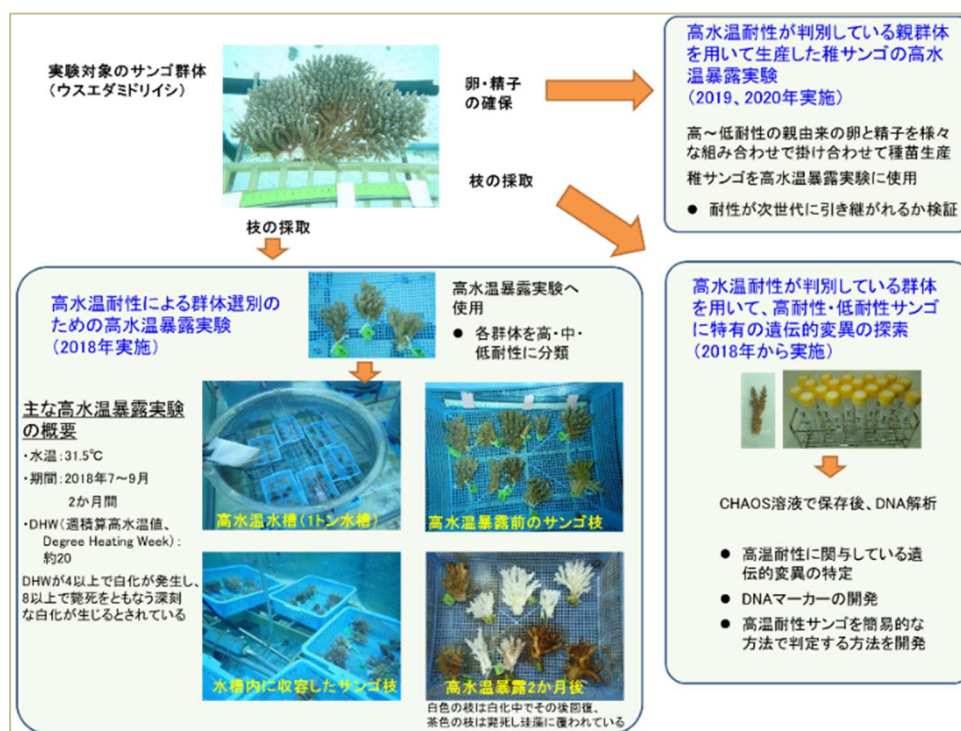


図-IV.7.1 DAN マーカー育種の概要

②従来の育種

一方、本調査では、DNA マーカー育種の技術が確立される以前から利用されている「従来の育種法」も用いて技術開発を行っている。遺伝情報が判明していない複数の親サンゴの卵と精子を一緒に混合して得られた0～2歳齢の稚サンゴを高水温に暴露し、生き残った個体を育成することにより、高水温耐性サンゴの選抜を行っている。

2 高水温耐性への遺伝子関与の検証

2.1 DNA 解析

2.1.1 DNA マーカーの開発

(1) DNA マーカー開発の概要

今回の DNA 解析の手法は以下の通りであった (図・IV.7.2)。

- ① 各群体から抽出した DNA から塩基配列¹を読み取り、すべての塩基を参照ゲノム配列²(Shinzato et al., 2021) に倣ってマッピングする (一列に並べる)。
- ② 全ゲノム解析により、塩基配列をサンゴ群体間で比較し、遺伝的変異 (一塩基置換 : SNP、一塩基欠失と一塩基挿入 : INDEL) を検出する。
- ③ 検出された遺伝的変異を高水温耐性と低耐性サンゴのグループ間で比較する。
- ④ この解析手法により、遺伝的変異の個数だけでなくゲノム上での位置も判明する。
- ⑤ ③および④で明らかとなった DNA 塩基配列の違いをマーカー候補とする。
- ⑥ マーカー候補の確実性を確かめるため、高水温耐性が明らかとなっている (高水温で生き残った、あるいは斃死した) 多数のサンプルについて、それらの塩基配列がマーカー候補と一致するか調べる。

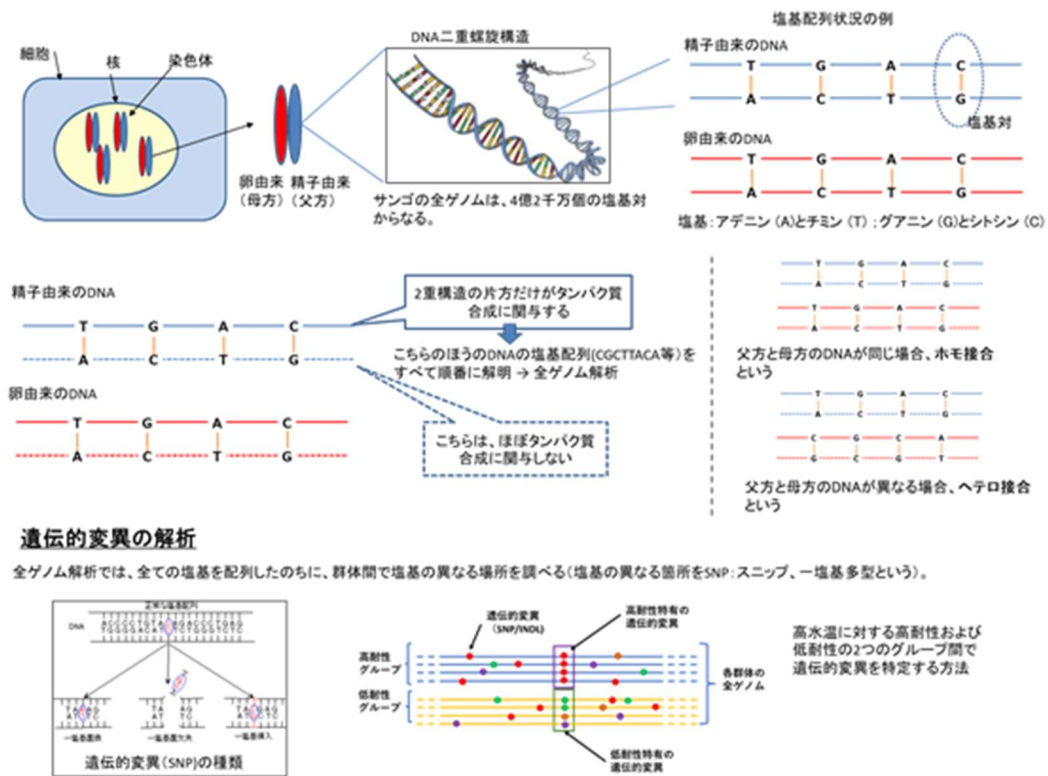


図-IV.7.2 DNA 解析手法の概要

¹ DNA (デオキシリボ核酸) は、リン酸、糖、塩基からなるヌクレオチドが重合したポリヌクレオチドであり、塩基成分にはアデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)の4種類がある。

² 参照ゲノム配列とは、先行の論文や報告等で、すでに全ゲノムの塩基配列の順番を記載してある手本のこと。

(2) 方法

1) 方法の概要

- 対象種: ウスエダミドリイシ 30 群体 (久米島産および沖ノ鳥島産の 1 歳齢～成体の群体)
- これらの群体は、2018 年度に高水温に暴露し、耐性が判明している (高耐性 or 低耐性)。
- 昨年度までに、有力な DNA マーカー (4 つの DNA 塩基配列の違い) が見つかった。
- この 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方法を開発することとし、当初の計画では、PCR で各群体の DNA マーカー部分の DNA を増幅 (増やすこと) した後、電気泳動法で高水温耐性 DNA マーカーを持つかどうか確認する方法 (図-IV.7.3) の開発を目指した。
- しかしながら、DNA マーカー周辺に個体変異が多く、DNA マーカー部分を PCR により増幅することが難しいことが判明したため、電気泳動法によってサンゴの高水温耐性を判別する方法を断念した。これに代わり、DNA マーカー部分を含む、より長めの DNA 領域を PCR によって増幅し、この領域の DNA 塩基配列を解読することにより耐性を判別する方法に変更し、これに必要となるプライマーの開発を行った。
- また、この塩基配列の解読により高水温耐性を判別する方法を用いて、過去の高水温暴露実験で得られたサンプル (約 500 群体。高水温暴露で生残したものと、斃死したもののサンプルあり) のうち、高水温で生残したものが確かに DNA マーカーと同じ塩基配列を持っているか検証した。

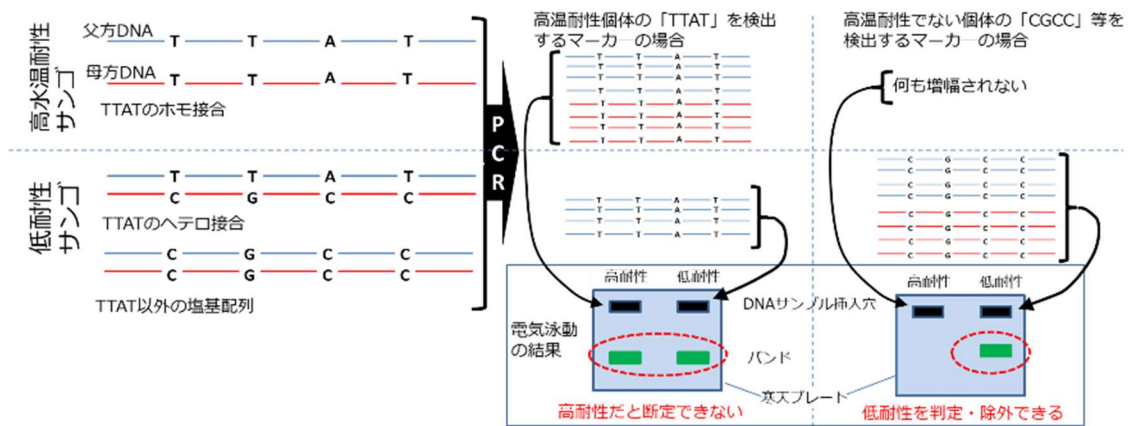


図-IV.7.3 簡易的かつ迅速な高温耐性群体の選別方法の開発のための計画の一案

2) 具体的な研究の方法

高温耐性に関わる可能性のある遺伝的変異 (SNP) が存在する DNA 領域の増幅と DNA 配列解読

昨年度までのゲノム解読とゲノム情報解析に使用し、現在まで DNA サンプルが残存している白化斃死 11 群体、高温耐性群体 9 群体を使用して、以下の分子生物学実験を行った。

昨年度までのゲノム解析により特定した、ウスエダミドリイシのゲノム配列(Shinzato et al., 2021)の参照配列番号 57 上に存在する 4 箇所の SNP の周辺領域について、同じく昨年度までに実施したウスエダミドリイシ複数群体のゲノム解読解析結果を活用し、SNP が存在しない周辺ゲノム領域を選別した。そして 4 箇所の SNP を全て含む DNA 領域を PCR 増幅するためのプライマーを設計した。以下のプライマーは、4 箇所の SNP を含んだ近傍領域 373bp を増幅する。

scaffold57_Fw: 5'- CAGATTCTCAAATATGTGTCGT -3'

scaffold57_Rv: 5'- TGTAAACTCCTAGCATCTCAGG -3'

上記 20 群体の DNA サンプルを用いて PCR を行い、4 箇所の SNP が存在する領域の増幅を行った。まず Blend Taq (TOYOBO)を用いて PCR を行い、増幅された DNA 断片を目視で確認後、電気泳動ゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて PCR 産物を精製した。その後 pGEM-T ベクター (Promega)に組み込み、プラスミド DNA を大腸菌に形質転換した。培養した個々の大腸菌のコロニーからプラスミドを抽出し、ユーロフィンジェノミクス株式会社へ送付して DNA の配列解読 (シーケンス) の外注を依頼した。父型、母型両方の SNP タイプを確認するため、1 群体あたり 10 個程度のプラスミドのシーケンスを行った。

実験手順を簡素化するため、PCR 産物をプラスミドに導入せず、直接シーケンスを行うことで SNP を特定する手法も実施した。上記 Blend taq よりもエラー率の低い、KAPA HiFi DNA Polymerase (KAPA Biosystems 社)を用いて PCR を行った。PCR 産物を電気泳動し、上記同様 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて PCR 産物を精製した。ユーロフィンジェノミクス株式会社へ DNA シーケンスを外注し、得られた波形データをもとに、4 箇所の SNP が存在する塩基のピークを確認することで、各サンプルの SNP 型を特定した。

(2) 結果および考察

分子生物学実験による、高温耐性に関わる可能性のある遺伝的変異の確認

設計した scaffold57_Fw, Rv プライマーを使用した PCR で、実験に使用した 20 群体全てから、推定増幅サイズの約 373bp の DNA の増幅が確認された (図-IV.7.4、KAPA HiFi を使用した例)。PCR 産物を直接シーケンスした波形データを確認したところ、SNP が存

在する塩基のピークを確認することで、SNP 型を特定することが可能であった。例として、久米島産の K9 と K16 (白化斃死群體)、O205 (高温耐性群體) の結果を図-IV.7.5～図-IV.7.7 に示す。SNP がホモである (父型と母型の SNP が同じ) 場合は単一のピークしか確認されないが、ヘテロである (父型と母型の SNP が異なる) 場合は、同じ場所に複数のピークが重なって確認される。

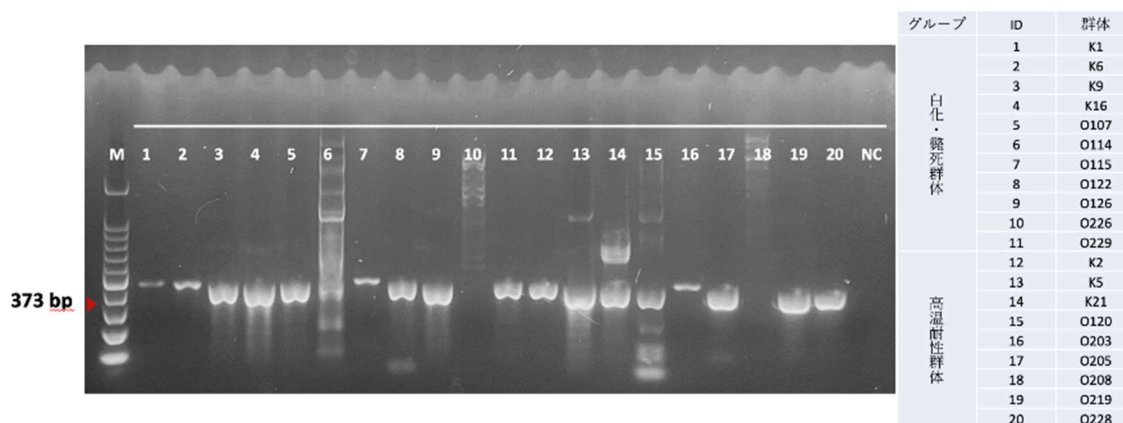


図-IV.7.4 参照配列 57 番の 4 つの SNP 周辺領域を増幅する PCR の結果の例
KAPA HiFi DNA Polymerase を使用した結果。推定 373bp のバンドの増幅が見られ、このサイズのバンドを切り出して精製し、DNA 配列の解読を行った。レーンごとの数字は、右の群體サンプルに対応している。M:DNA サイズマーカー、NC:ネガティブコントロール。

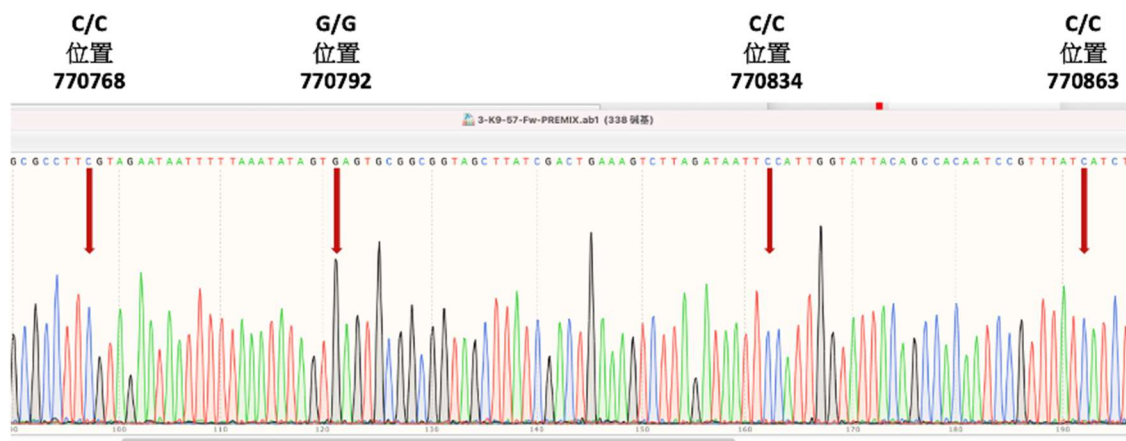


図-IV.7.5 久米島産、K9 (白化斃死群體) の参照配列番号 57 上の 4 つの SNP の周辺領域の DNA シーケンスの波形データ
4 つの SNP の位置を赤矢印で示す。C/C などホモになっている場合は、単色のピークのみが確認される。

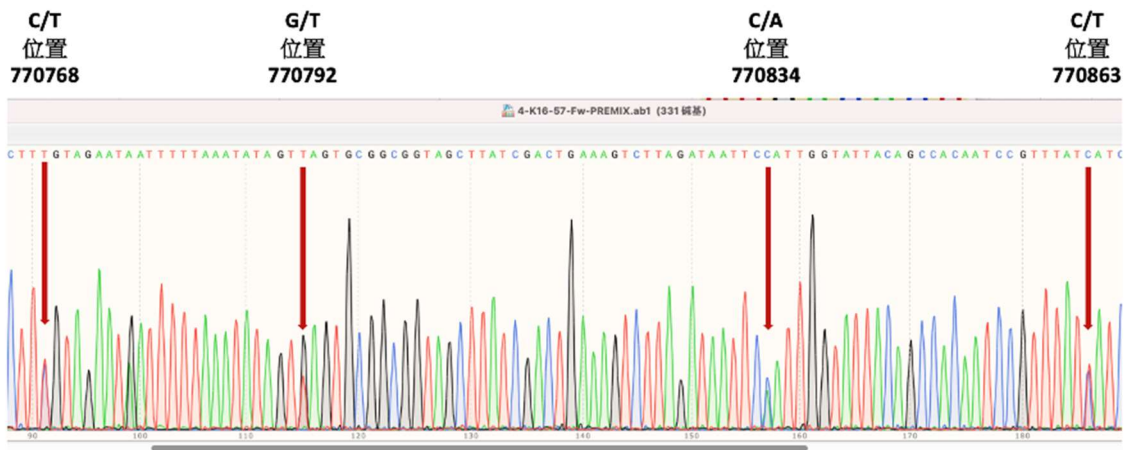


図-IV.7.6 久米島産、K16（白化斃死群体）の参照配列番号 57 上の 4 つの SNP の周辺領域の DNA シーケンスの波形データ
4 つの SNP の位置を赤矢印で示す。C/T などヘテロになっている場合は、異なる色のピークが同じ場所にオーバーラップして確認される。

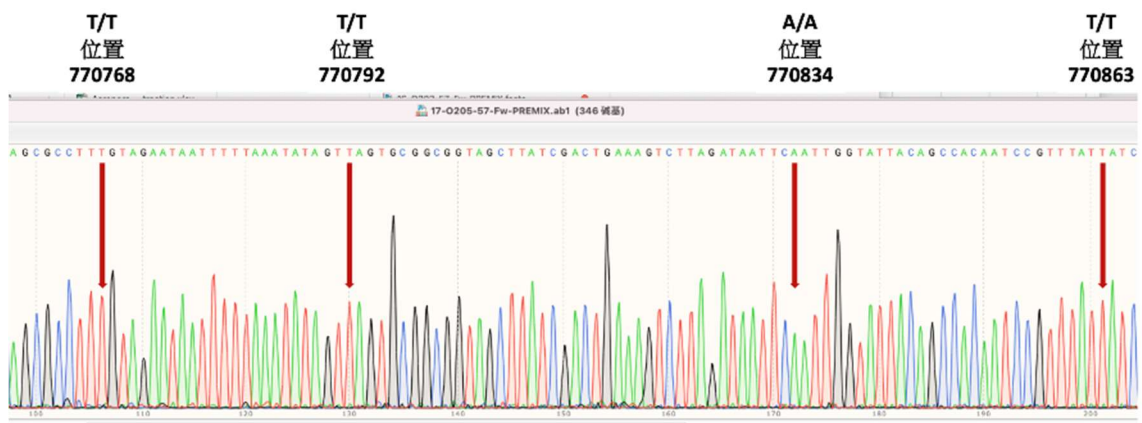


図-IV.7.7 久米島産、0205（高温耐性群体）の参照配列番号 57 上の 4 つの SNP の周辺領域の DNA シーケンスの波形データ
4 つの SNP の位置を赤矢印で示す。T/T などホモになっている場合は、単色のピークのみが確認される

PCR 増幅産物をプラスミドに組み込み、個々の DNA 配列を解読することにより、SNP の遺伝子型特定も行った。父型母型両方の DNA 配列を確実に解読するため、それぞれの群体から 8-10 個のプラスミドの DNA シーケンスを行った (表-IV.7.1)。全ての群体において、上で述べた PCR 産物のシーケンス結果 (波形データ) から特定した SNP 型と、同じ SNP 型の結果が得られることを確認した。そのため、PCR 産物の直接の DNA シーケンスを行っても、SNP の遺伝子型の特定が可能であると結論づけた。昨年度のゲノム解析による SNP 型の特定と一部異なる結果 (表-IV.7.1, 緑色) が得られたが、T, T, A, T をホモで持つものは、高温耐性群体のみに確認された。

さらなる実験手法の効率化を目指し、DNA 配列解読を必要としない、PCR 法のみで SNP 型の特定を行う簡便な手法の開発を試みた。そのためには 4 箇所の SNP 上に PCR プライマーを作成しなければならないが、SNP に隣接した DNA 配列は個体差が大きく、全ての群体に使用可能なプライマーの設計が困難であった。そのため、PCR 法のみで SNP 型を特定する簡便な手法の確立は断念し、DNA 解読を含む手法を採用することに決定した。

表-IV.7.1 分子生物学的手法による、参照配列 57 番の 4 箇所の SNP 型の特定
今年度の分子生物学実験により SNP 型の特定を行った 20 の群体は黄色で色塗りがされている。昨年度報告のゲノム解読による SNP 型特定の結果と異なる遺伝子型と確認されたものを緑色の文字で示す。Number of clones: SNP 型確認のために DNA 解読したプラスミドの数。

グループ	群体	参考配列番号：57 位置：770768	参考配列番号：57 位置：770792	参考配列番号：57 位置：770834	参考配列番号：57 位置：770863	Number of clones
白化・ 斃死群 体	K1	T/C	T/G	A/C	T/C	10
	K6	T/T	T/T	A/A	T/T	8
	K9	C/C	G/G	A/C	T/C	10
	K16	T/C	T/G	A/C	T/C	10
	O102	C/C	G/G	C/C	C/C	
	O107	C/C	G/G	C/C	C/C	10
	O114	T/C	T/G	A/A	T/T	10
	O115	T/C	G/G	A/A	T/T	9
	O122	C/C	G/G	C/C	T/C	10
	O126	C/C	G/G	C/C	T/C	10
	O128	C/C	G/G	C/C	C/C	
	O226	T/C	T/G	A/C	T/C	10
	O229	C/C	G/G	C/C	C/C	10
	O230	C/C	G/G	C/C	C/C	
O410	T/C	T/G	A/C	T/C		
O414	C/C	G/G	C/C	C/C		
遺伝子型		C/C, T/C	C/C, G/G, T/G	C/C, A/C	C/C, T/C	C/C, T/C
高温 耐性 群 体	K2	T/T	T/T	A/A	T/T	10
	K5	T/T	T/T	A/A	T/T	10
	K21	T/T	T/T	A/A	T/T	10
	O120	T/C	T/G	A/C	T/C	11
	O203	T/C	T/G	A/C	T/C	11
	O205	T/T	T/T	A/A	T/T	9
	O208	T/C	T/G	A/C	T/C	10
	O219	T/T	T/T	A/A	T/T	10
	O228	T/C	T/G	A/C	T/C	10
	O405	T/T	T/T	A/A	T/T	
	O415	T/T	T/T	A/A	T/T	
遺伝子型		T/T	T/T	A/A	T/T	

(3) 今後の課題

現在までのゲノム情報解析により、ウスエダミドリイシの高温耐性に関わっている可能性のある遺伝的変異（参照配列 57 番の 4 つの SNP）の候補を特定し、様々なウスエダミドリイシ群体からその遺伝的変異を確認する実験手法を開発した。来年度は、これら SNP 情報で高水温耐性を持つウスエダミドリイシ群体を見分けられるのか、その実証実験を行う計画をしている。

- ・ 特定した 4 箇所の SNP の有効性の検証：今年度開発した 4 箇所の SNP 領域全体を増幅するプライマーを用いて、2019、2020 年に行われた高水温暴露実験に使用した群体由来の DNA サンプルから、PCR 増幅・DNA 配列解読を実施し、SNP 型の特定を進める。4 箇所の SNP 情報で、高水温暴露実験において耐性を示した群体を区別できるのか、数多くのサンゴのサンプルを使用した統計解析等を行い、検証する。
- ・ 新規 SNP の解析：ゲノム解析結果を再検証した結果、上の 4 箇所とは全く別の 1 箇所の SNP についても、高水温耐性に関わる可能性が浮上した。この SNP 型を確認するための手法開発も行う。

2.1.2 高温耐性の遺伝的特徴の次世代への継承に関する確認

(1) 方法

2018 年度の高水温飼育試験（31℃、2 か月間）にて、高水温に対する耐性によって親サンゴ（久米島産ウスエダミドリイシ）を高耐性、中耐性、低耐性の 3 つのグループに選別した。2019 および 2020 年度に、これらの親群体を用いて種苗生産した 0 歳齢の「組み合わせ交配サンゴ」を高水温に暴露し、どの組み合わせの稚サンゴが生残するか、また、子は親の高水温耐性を引き継ぐかを確認する実験を行った。

この実験より得られた合計 451 個のサンプルから、CHAOS バッファーを用いた DNA 抽出手法(Fukami et al., 2000)により、DNA を抽出した。

上記の参照配列番号 57 上に存在する 4 箇所の SNP の周辺領域を増幅するプライマーを用いて、PCR 増幅と DNA シーケンスを行い、DNA シーケンスの波形データから、それぞれのサンプルの SNP 型を特定した。

(2) 結果

上記の 451 個の全てのサンプルからの DNA 抽出を完了した。上記で開発した PCR 法と DNA シーケンスの波形データを確認する手法を用いて、これらのサンプルの参照配列 57 番の 4 箇所の SNP の遺伝子型の特定を進めている。

2.2 0歳令稚サンゴの高水温飼育実験

(1) 方法

上述のように、2018年度の高水温飼育試験で高水温耐性が判別された親サンゴから得られた卵と精子を用いて、2019 および 2020 年度に「組み合わせ交配サンゴ」を生産し、これらの稚サンゴを高水温に暴露することにより、子は親の高水温耐性を引き継ぐかを確認する実験を行った。しかし、「1. はじめに」で述べたように好ましい成果が得られていない。このため、本年度も「組み合わせ交配サンゴ」の種苗生産とこれらの高水温暴露実験を実施した。

高水温暴露実験は、1 トン円形ポリカーボネイト水槽内に約 1 か月齢の稚サンゴを収容して行った。水槽内の水温は、8月3日から9月1日の約 1 か月間、31.5℃に保ち、その後約 1 週間において馴致のため徐々に常温から上昇もしくは降下させた（図-IV.7.8）。



図-IV.7.8
稚サンゴの高水温暴露実験の状況
上左：実験水槽外観（1 トン円形水槽）、
上右：水槽に収容した着床具
（10 cm角タイル）
下：実験開始直前の稚サンゴ
（直径約 3 mm）

(2) 結果および考察

「組み合わせ交配サンゴ」の種苗生産および高水温暴露実験の結果を表-IV.7.2 に示す。

6月1日および2日の産卵より、高耐性×低耐性（2通りの組合せ）、低耐性×低耐性（2通り）の稚サンゴを確保した。7月初旬にも産卵があったが、高耐性の4群体の産卵日が同調せず、結局、今年度は高体性×高耐性の組合せの稚サンゴは確保することができず、6月産卵より得られたサンゴを用いて高水温実験を行った。

低耐性同士の組み合わせ（No.10×No.18）では受精率が低かったが、これらの群体は遺伝的に相性が悪い可能が考えられる。一般に、遺伝的に近い群体同士は受精率が低くなる、もしくは全く受精できない場合があると考えられている。

今回の実験では、合計 527 個体のサンゴを用いて高水温暴露を行ったところ、2 か月後に生残していた群体は、高耐性×低耐性（No.21 の精子×No.18 の卵）の組み合わせの 1 群体のみであった。このため、今年度も実験の目的である、配偶子の組み合わせによる高水温下での生残率の比較、ならびに親から子への高水温耐性に関する遺伝的特徴の継承について確認することができなかった。

今回の課題は、高水温耐性を持つ親サンゴの産卵が同日に行われなかったため、目的とした組み合わせの稚サンゴを種苗生産できなかった点である。このため、耐性判別済の親群体数を増やすため、現在飼育中で高水温耐性が分かっていない親サンゴ 11 群体を、7 月 13 日より 1 か月間 31.5℃の水温で高水暴露した。その結果、いずれの群体も実験期間中に白化・斃死し、低耐性のサンゴであった。今後、来年度の産卵までに、新たに海域よりサンゴを採集し、これらを高水温暴露することによって高耐性サンゴの十分な群体数を確保する必要がある。

表-IV.7.2 稚サンゴの高水温暴露実験の結果

		精子		
		No.10 (低耐性)	No.18 (低耐性)	No.21 (高耐性)
卵	No.10 (低耐性)		35.5%	
	No.18 (低耐性)	14.5%		92.5%
	No.21 (高耐性)	100.0%		

		精子		
		No.10 (低耐性)	No.18 (低耐性)	No.21 (高耐性)
卵	No.10 (低耐性)		129	
	No.18 (低耐性)	24		143
	No.21 (高耐性)	231		

		精子		
		No.10 (低耐性)	No.18 (低耐性)	No.21 (高耐性)
卵	No.10 (低耐性)		0	
	No.18 (低耐性)	0		1
	No.21 (高耐性)	0		

2.3 2歳令高水温耐性サンゴの耐性維持および海域環境への適応

(1) 方法

高水温で選抜したサンゴが2歳令でも高水温耐性を維持していることを確認するために、2019年度の0歳齢および2020年の1歳齢時点での高水温暴露実験で生残した「組み合わせ交配サンゴ」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、海域飼育を開始した。

過年度および本年度の飼育状況は以下の通りであった。

【過年度】

- ・ 対象サンゴ：2019年産久米島ウスエダミドリイシ稚サンゴ
- ・ 2019年7～9月の2か月間、高水温暴露（水温：31.5℃）（666群体→238群体生残）
- ・ 高水温暴露後、常温にて10か月間、生残群体を飼育（238群体→206群体生残）
（1才齢時点でDNA解析用のサンプル採取）
- ・ 2020年7～9月の2か月間、高水温暴露（水温：31.5℃）（206群体→205群体生残）
- ・ 高水温暴露後、常温にて10か月間、生残群体を飼育（205群体→117群体生残）
※2020年冬期から2021年夏期の期間に白化・病気が発生し生残数低下
※白化・病気発生の原因は不明

【本年度】

- ・ 上記の生残群体117のうち、一部の群体は白化気味もしくは群体の一部が病気に罹患していたため、これを除く健康な89群体を以下の実験に用いた。

- ①水槽内にて高水温で飼育（31.5℃、8月3日より1か月間） 25群体（図-IV.7.9）
- ②海域（久米島、仲里漁港内）の棚にて飼育（7月31日開始） 23群体（図-IV.7.10）
- ③水槽内において常温での継続飼育 41群体（図-IV.7.11）



図-IV.7.9 稚サンゴの高水温暴露実験の状況
左：高水温水槽（1トンポリカーボネイト水槽）、右：実験に用いたサンゴ

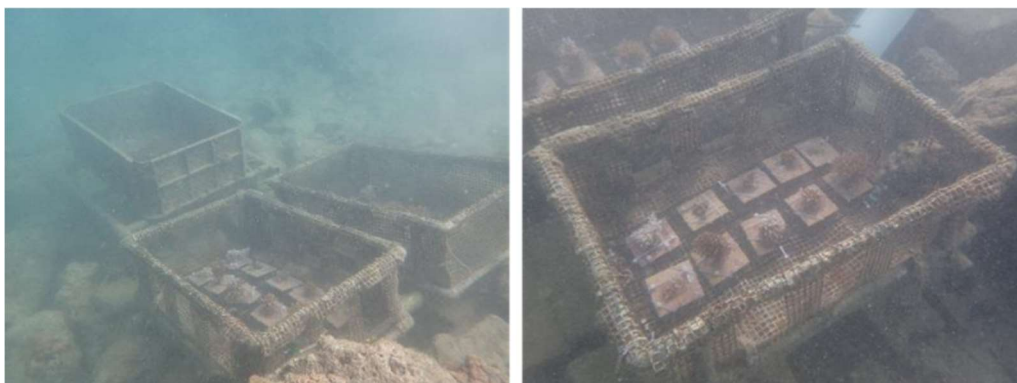


図-IV.7.10 稚サンゴの実海域での飼育の状況
左：水深約 DL-2m に設置した飼育カゴ、右：カゴ内に収容したサンゴ



図-IV.7.11 稚サンゴの水槽内での常温飼育の状況
左：飼育水槽（5 トン FRP 水槽）、右：飼育したサンゴ

(2) 結果および考察

昨年度の高水温暴露においては、206 群体のうち、斃死数はわずか 1 群体であった。しかしその後、2020 年冬期から 2021 年夏期の間には白化した群体が増え、これに引き続き細菌性の病気により病死する群体が多数生じた。冬期の水温および光量は例年と変わらず、最低水温は 23℃程度、水槽内の光量子量は空中比約 30%であった。白化する群体が発生した時点で光量を少なくすることにより（空中比 10%程度の光量子量）白化は軽減されたが、病気の発生は続いた。白化および病気が生じた原因は不明であった。

本年度の高水温および実海域、水槽内での常温の飼育結果を表-IV.7.3 に、サンゴの状態を図-IV.7.12 に示す。水槽内常温飼育での生残率が 56%であったのに対し、高水温および実海域での生残率は水槽内常温飼育より高く、約 70%であった。水槽内常温飼育における主な斃死原因は病気であった。高水温での斃死原因も白化と病気であった。実海域での斃死原因については、毎日観察できていないので不明であるが、藻類との競合や害敵であるシロ

レイシガイダマシの侵入は見られなかったため、おそらく病気が斃死原因ではないかと推定される。

今回の実験においては、実験前からサンゴ状態が良好でなかったことと、対照試験区の水槽内常温飼育の生残状況が芳しくなかったことから、2歳齢においても高水温耐性を維持し、実海域の環境にも適応が可能であると明確に判断することは難しい。しかし、これらの試験区における生残率が約70%であったことから、高水温耐性を維持し、実海域環境へも適応可能である可能性は高いのではないかとと思われる。3歳齢時点でも同様な実験を行う予定であるので、来年度に再検証を行うこととしたい。

表-IV. 7.3 稚サンゴの高水温暴露実験の状況

	群体数		生残率
	実験開始時	実験後	
水槽内高水温	25	17	68.0%
海域カゴ	23	17	73.9%
水槽内常温	41	23	56.1%

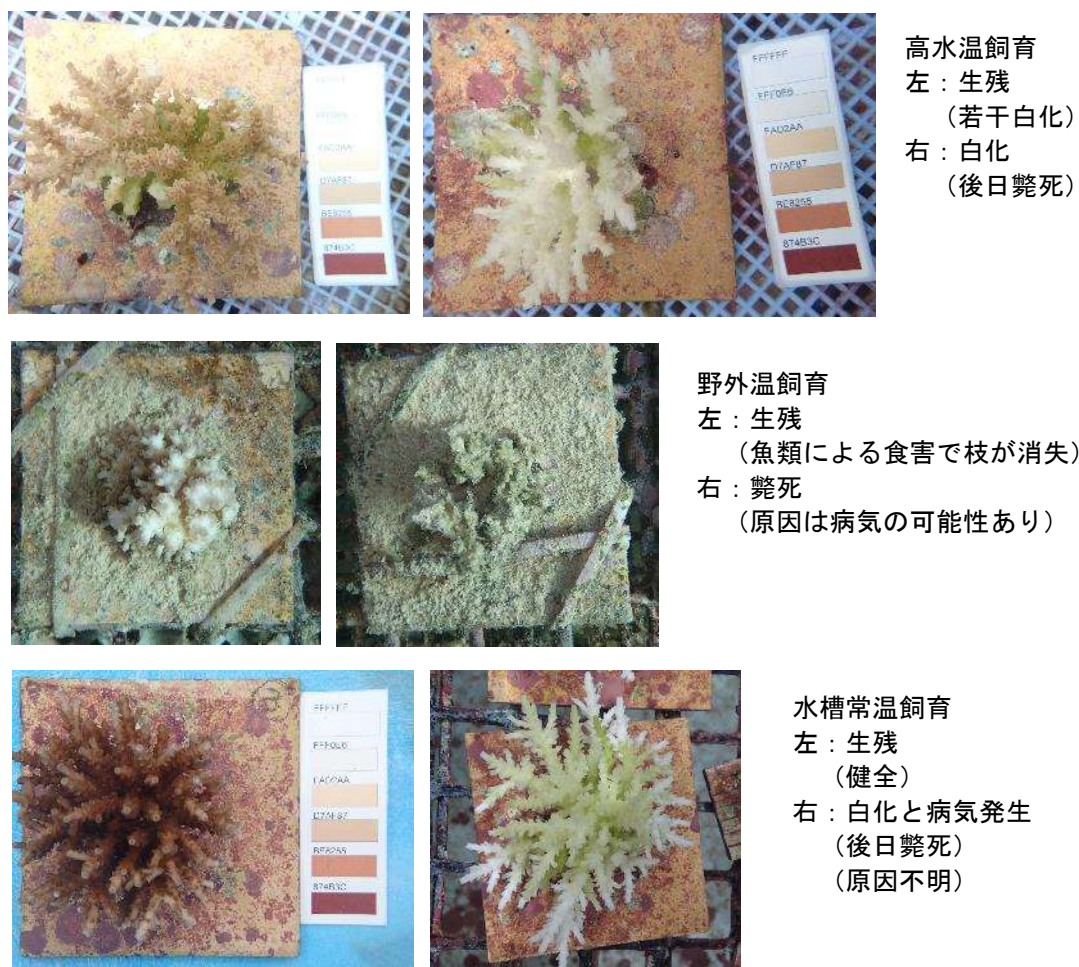


図-IV. 7.12 実験後のサンゴの状況

3 従来の手法による高水温耐性サンゴの育種

育種の概要

DNA マーカーが開発される以前の育種（品種改良ともいう）の技術として、特定の条件下で継代飼育（植物の場合は継代培養）して、特定の条件下で生き残った個体を選抜していく方法がある。本技術開発では、DNA マーカーの開発を併せて、この従来法による育種も進めている。

3.1 高水温耐性サンゴの飼育環境の把握

(1) これまでの経緯

2019年に高水温耐性が判別されていない沖ノ鳥島産ウスエダミドリイシの親サンゴ9群体の配偶子を一緒に混ぜ合わせて種苗生産した稚サンゴ672群体を2019年7～9月の2か月間高水温（31.5℃）に暴露し、これらの群体から高耐性サンゴ80群体を選抜した。その後、過去の試験により明らかとなっている通常のサンゴ（高水温暴露していないサンゴ）の好適な飼育条件で飼育し、従来の方法でも飼育が可能であるかを検証している。飼育条件は以下の通りであった。

- ・ 空中に対する水中の光量子量：約40%（遮光ネットを用いて光量を調整した）
- ・ 水温：21～29℃（夏季に飼育海水を冷却した）
- ・ 水流：5cm/秒程度（エアレーションにより水槽内に水流を発生させた）

2019年の高水温暴露後から2021年3月までの生残サンゴ数および生残率は、それぞれ67群体、83.8%であった。

(2) 方法

今年度も同様な飼育条件下で水槽内飼育を継続した（図-IV.7.13）。



図-IV.7.13 実験後のサンゴの状況

左：飼育に用いた5トンFRP水槽、中：水槽内でのサンゴ配置、右：飼育サンゴ近景

(3) 結果および考察

2022年3月13日時点での生残サンゴ数は64群体で、本年度における生残率は95.6%であった。本年度においては3群体が斃死したが、主な斃死原因は細菌性の病気であった。夏期に10群体程度が若干白化気味になったが、それらの群体については光量を少なくした場所に移したところ数週間で回復した。

成長に関しては、ほとんどの群体が直径12cmを超えている(33か月齢)。過去の飼育における平均直径は、12か月で約2cm、24か月で約5cm、36か月で約10cm、48か月で約15cmであったが、これと比較して、現在飼育中の高水温耐性サンゴは成長が良好である。

このように、生残率が高く、また成長も良好であることから、現在の飼育環境は高水温暴露によって選抜した高水温耐性サンゴにとっても好適であったと考えられる。

3.2 今年度の高水温暴露選抜

(1) これまでの経緯

2019年および2020年に、高水温耐性が判別されていない9~10群体の親群体の配偶子を一緒に混ぜ合わせて種苗生産し、これらの0歳令稚サンゴを高水温に暴露して選抜を行った。今年度もこれらの高水温にて生残した稚サンゴの飼育を継続している。

(2) 方法

今年度は新たに、以下のサンゴについて、昨年と同様な飼育条件(31.5℃にて1か月)にて高水温による群体の選抜を実施した。

- ・2017年産および2019年産、2021年産沖ノ鳥島ウスエダミドリイシ
- ・2018年産および2019年産、2020年産沖ノ鳥島 *Acropora globicrps*

(3) 結果および今後の予定

過年度および今年度に選抜した高水温耐性サンゴの群体数を表-IV.7.4に示す。

選抜したサンゴは、「3.1 高水温耐性サンゴの飼育環境の把握」において明らかとなった適正環境条件にて飼育を継続している。なお、2018年産沖ノ鳥島 *A. globicrps* については、2022年3月時点において高水温暴露を継続中であり、4月に選抜が完了する予定である。

来年度以降においても、生残してるサンゴの飼育を継続し、親サンゴサイズまで育成する予定である。また、ウスエダミドリイシについては、令和5~7年度に予定されている幼生拡散試験に使用するために、順次沖ノ鳥島へ移送する予定である。今後、沖ノ鳥島への移送方法の検討を行う必要がある。

現在は、ウスエダミドリイシの高水温耐性について技術開発を行っているが、海域において種の多様性を保つためには、技術開発の対象種を増やす必要がある。今年度に高水温選抜を行った *A. globicrps* は、以前は沖ノ鳥島における優占種の1種であったが、近年は高水温等

により生息群体数が減少している。このため、本種は、次の技術開発の対象種として適切であると考えられる。

表-IV. 7. 4 高水温暴露による選抜結果

生産年	高水温暴露年 (年齢)	高水温暴露選抜群体数		2021年度末 生残数
		暴露前	暴露直後生残	
ウスエダミドリイシ				
2019	2019 (0歳齢)	672	154	64
2019	2021 (2歳齢)	457	284	157
2020	2020 (0歳齢)	2,095	235	152
2021	2021 (0歳齢)	1,359	132	90
合計		4,583	805	463
グロビセプス				
2019	2021 (2歳齢)	686	8	7
2020	2021 (1歳齢)	653	259	240
合計		1,339	267	247

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.
- Fukami H, Omori M, Hatta M (2000) Phylogenetic relationships in the coral family acroporidae, reassessed by inference from mitochondrial genes. *Zoolog Sci*, 17, 689-96.
- 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. *Mol Biol Evol*, 38, 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.