

VIII 高温耐性型サンゴの種苗生産技術の開発

目 次

VIII 高温耐性型サンゴの種苗生産技術の開発

1	はじめに	VIII-1
2	高温耐性への遺伝子関与の検証	VIII-3
2.1	DNA マーカーの開発	VIII-3
(1)	DNA マーカー開発の概要	VIII-3
(2)	昨年度までの結果	VIII-4
(3)	今年度の DNA マーカー開発に関する研究	VIII-5
2.2	高温暴露実験	VIII-6
(1)	方法	VIII-6
(2)	結果および考察	VIII-7
2.3	今後の展望	VIII-9
3	従来法による高温耐性サンゴの育種	VIII-9
3.1	高温選抜サンゴの高温耐性維持の確認	VIII-9
(1)	方法	VIII-10
(2)	結果および考察	VIII-10
3.2	高温耐性サンゴの飼育環境の把握	VIII-11
(1)	方法	VIII-11
(2)	結果および考察	VIII-11

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。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。

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-VIII. 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。

- ・ 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、昨年度に引き続き、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。高水温暴露において、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。この原因は現在のところ不明である。このため、本年度も過年度に引き続き、「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行い、高耐性の親由来の卵と精子を交配した稚サンゴは、高水温においてより高い生残率を示すかどうか、また親サンゴの高水温耐性が稚サンゴへ引き継がれるかどうかを調べた。ただし、2018年に高水温暴露により高水温耐性を判別した親サンゴが病気により斃死し群体数が少なくなったことから、新たに海域より親サンゴを採取した。これらの群体から折り取った枝を高水温暴露することにより各群体の高水温耐性を判別し、高耐性および低耐性を示した群体を種苗生産に用いた。

【実施内容の概要】

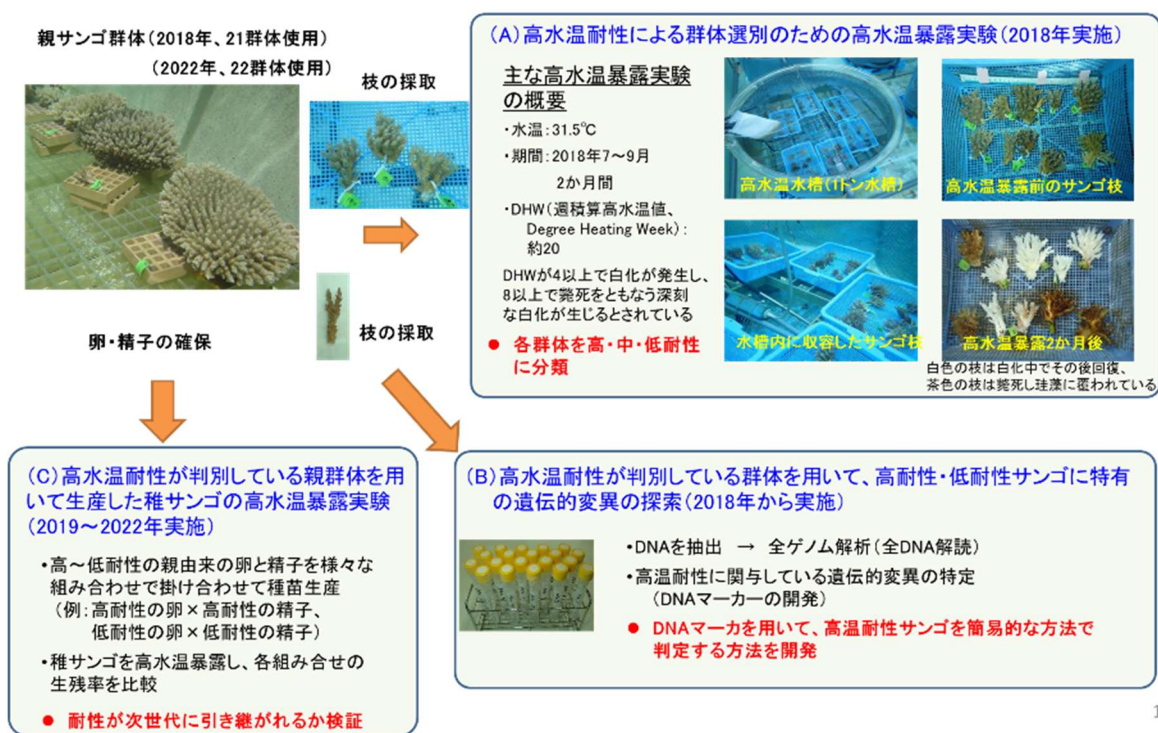


図-VIII.1 DNA マーカー開発のための実験の流れ

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様々な生物において利用されている「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。

また、本調査では、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2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3歳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 高水温耐性への遺伝子関与の検証

2.1 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-VIII.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。

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。

マー（以下に塩基配列を示す）を開発した。

scaffold57_Fw: 5'- CAGATTCTCAAATATGTGTCGT -3'

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 373bp を増幅する。

- ・ PCR で増幅した DNA の塩基配列を解読し、DNA 上の特定の位置の塩基が「T/T, T/T, A/A, T/T」であれば高耐性、それ以外の塩基であれば低耐性とする判別方法を開発した。

(3) 今年度の DNA マーカー開発に関する研究

1) 方法

本年度は、昨年度開発した高水温耐性に関わっている可能性のある 4 箇所の遺伝的変異 (SNP) が位置するウスエダミドリイシのゲノム領域を特異的に増幅する PCR プライマーを用いて、多数のウスエダミドリイシのサンプルからの PCR 増幅と SNP 型の特定が可能なのか、過去の高水温暴露実験に使用された約 450 群体のウスエダミドリイシの稚サンゴのサンプルを用いて検証した。これまでの我々のウスエダミドリイシの全ゲノム解析から、上記の 4 箇所の SNP を、T/T, T/T, A/A, T/T のホモで持つ群体 (TTAT ホモ) が高温耐性を持っている可能性が示唆されている。2019 年、2020 年に実施された稚サンゴの高水温暴露実験で、TTAT ホモの群体が高水温条件下で優先して生き残ったのかを確認した。

2) 結果および考察

2019,2020 年に実施された稚サンゴを用いた高水温暴露実験で、TTAT ホモの群体が高水温条件下で優先して生き残ったのか、TTAT ホモを持つ群体の割合が高水温暴露後に増えるのかを確認した。様々な掛け合わせごとや高水温暴露実験を行った年ごとなど、統計解析で様々な比較を行ったが、高水温暴露の前後での TTAT ホモの、統計的に有意な割合の差は確認されなかった。今回の稚サンゴを用いた高水温暴露実験からは、TTAT ホモを持つ群体が高水温下で優先して生き残るという結果は得られなかった。

一方で、2018 年に実施された久米島と沖ノ鳥島産の親サンゴの高水温耐性の有無の判定において、TTAT ホモの群体の中で高水温耐性を持つと判定された群体の割合は、それ以外の SNP 型の群体よりも有意に高いという結果が得られた (表-VIII.2、フィッシャー正確確率検定, $p < 0.01$)。2019、2020 年の高水温暴露実験においては、稚サンゴの生育状況、受精時の卵の発育状況など、高水温以外にも様々な要因が稚サンゴの生残に影響を与えた可能性がある。TTAT ホモを持つ群体が他の SNP 型と比べて高水温耐性を持つかの判断には、さらなる実証実験が必要だと考えられる。

表-Ⅷ.2 2018年度に実施された親サンゴの高水温耐性判定結果と、TTAT ホモと持つ
 群体とそれ以外の SNP 型を持つ群体の対応
 (高い高水温耐性を持つと判定された群体は高、中程度は中、低い耐性を持つと判定された群
 体は低、と記載)

	サンプルID	2018年の高水温耐性の判断結果
TTATホモ	K2	高
	K4	高
	K5	中
	K7	中
	K11	高
	K14	中
	K18	低
	K21	高
	O120	高
	O205	高
	O219	高
O228	高	
それ以外の SNP型	K1	低
	K3	高
	K8	中
	K9	低
	K10	低
	K15	高
	K16	低
	O107	低
	O122	低
	O126	低
	O203	高
O229	低	

2.2 高水温暴露実験

2019年および2020年に「組み合わせ交配サンゴ」の種苗生産と、種苗生産した稚サンゴの高水温暴露実験を行ったが、高耐性の親由来の卵と精子の組み合わせにおいて稚サンゴの生残率が高くなる傾向が見られていない。このため同様な試験を本年度も実施した。

(1) 方法

1) 親群体の確保

2022年4月に新たに海域より22群体を採集し、これらの枝を高水温31.5～32℃で1か月間暴露して各親群体の高水温耐性を判別した(高・中・低耐性)。また、これらの親群体のDNAを解析した。

2) 種苗生産

5月23～26日および6月22, 23日に自然産卵された卵と精子を用いて種苗生産を行った。種苗生産では、同じ日に産卵した高耐性および低耐性の親由来の卵と精子を用いて、可能な限り多くの組み合わせで交配し稚サンゴを生産した。

3) 高水温暴露試験

8月もしくは9月より、19通りの組み合わせで生産した稚サンゴ1,966群体を約1か月間、31.5～32℃で高水温暴露した。高水温暴露終了後に各組み合わせの生残率を比較し、高耐性×高耐性が高生残率となるか検証した。また、高水温暴露前後に稚サンゴからDNAを採取し塩基配列を解析した。

(2) 結果および考察

1) 親群体の高水温暴露

水槽での高水温暴露で、5群体が高い高水温耐性を示した。一方、DNA解析では7群体がTTATホモであったが、水槽実験での結果と一致する比率は低かった(表-VIII.3)

表-VIII.3 親サンゴ高水温暴露実験およびDNA解析結果

群体番号	水槽実験からの耐性判定	SNP型 (DNA塩基配列)				一致
		T/C	T/G	A/C	T/C	
B1	中	T/C	T/G	A/C	T/C	○
B2	低	C/C	G/G	C/C	C/C	○
B3	中	T/C	T/G	A/C	T/C	○
B4	中	T/T	T/T	A/A	T/T	×
B5	中	T/C	T/G	A/C	T/C	○
B6	中	T/C	T/G	A/C	T/C	○
B7	中	C/C	G/G	C/C	C/C	○
B8	高	T/C	T/G	A/C	T/C	×
B9	中	T/C	T/G	A/C	T/C	○
B10	中	T/T	T/T	A/A	T/T	×
B11	中	C/C	G/G	C/C	C/C	○
B12	低	T/T	T/T	A/A	T/T	×
B13	高	T/C	T/G	A/C	T/C	×
B14	中	T/T	T/T	A/A	T/T	×
B15	中	T/T	T/T	A/A	T/T	×
B16	高	T/C	T/G	A/C	T/C	×
B17	中	T/C	T/G	A/C	T/T	○
B18	中	C/C	G/G	C/C	C/C	○
B19	高	T/C	T/G	A/C	T/C	×
B20	高	T/T	T/T	A/A	T/T	○
B21	中	T/C	T/G	A/C	T/C	○
B22	低	T/T	T/T	A/A	T/T	×
一致						12
不一致						10
一致率						55%

2) 稚サンゴの高水温暴露

親サンゴの高水温暴露による耐性結果を基にすると、高水温暴露後の稚サンゴの生残率は、親の耐性の特徴を引き継ぐような結果にはなっていない(表-VIII.4)。

一方、親サンゴのDNA解析結果を基にすると、TTATホモ同士の組合せにおいて、稚サンゴの生残率が高くなる傾向がみられる(表-VIII.5)。

表-VIII.4 水槽内での高水温暴露実験における、卵と精子の各組み合わせの稚サンゴの生残率

		精子							
		B2 (低耐性)	K3 (高耐性)	B12 (低耐性)	B13 (高耐性)	B19 (高耐性)	B20 (高耐性)	K21 (高耐性)	B22 (低耐性)
卵	B2 (低耐性)		16.3%	4.3%	5.0%			28.8%	6.5%
	K3 (高耐性)	17.7%			19.2%				29.9%
	B12 (低耐性)	25.4%						54.0%	
	B13 (高耐性)	37.4%	28.6%						8.1%
	B19 (高耐性)								
	B20 (高耐性)					40.5%			
	K21 (高耐性)	33.0%		36.4%					
	B22 (低耐性)	23.1%	16.4%		1.9%				

赤字：高耐性の親群体もしくは「高耐性×高耐性」の組み合わせ交配の稚サンゴ
 空欄：産卵日が同調せず、交配できなかった組み合わせ

表-Ⅷ.5 TTAT ホモ同士の組み合わせ (No12 卵×No. 21 精子) の生
残率 54%とその他の組み合わせの間での統計的比較
(* : 有意差があった組合せ ; ★ : 有意差が無かった組合せ)

		精子							
		B2	K3	B12	B13	B19	B20	K21	B22
卵	B2		*	*	*			*	*
	K3	*			*				*
	B12	*						54%	
	B13	*	*						*
	B19								
	B20					★			
	K21	*		★					
	B22	*	*		*				

赤字 : TTAT ホモの親群体
赤塗のセル : TTAT ホモ同士の組み合わせ
フィッシャーの正確確率検定 (P<0.05)

2) 稚サンゴの遺伝的特徴

各組み合わせ交配における遺伝型の出現率に関して、メンデルの法則にしたがった理論的な値と実際の交配実験での値を表-Ⅷ.6 に示す。

実際の交配における遺伝型 TTAT ホモの DNA を持つ稚サンゴの出現率は、期待される比率と大きく異なった。これは、DNA マーカー部分の DNA の特徴が親から子へ引き継がれていない場合が多いことを意味する。原因は全く不明であり、今後の検討を要する。

表-Ⅷ.6 稚サンゴにおける TTA ホモ群体の出現率

交配に用いた 親群体の組合せ			稚サンゴにおけるTTATホモの出現率		
			期待される比率	実験結果	
				高水温暴露前	高水温暴露後
TTATホモ	×	TTATホモ	100%	30%	33%
TTATホモ	×	TTATヘテロ	50%	70%	50%
TTATホモ	×	TTATなし	0%	16%	28%
TTATヘテロ	×	TTATヘテロ	25%	-	-
TTATヘテロ	×	TTATなし	0%	0%	17%
TTATなし	×	TTATなし	0%	0%	0%

※「TTAT なし」は、TTAT の塩基配列を持たない群体
(TTAT ホモおよび TTAT ヘテロ以外の群体)

3) 高水温暴露実験のまとめ

今回の実験では、本技術開発の目的である「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、および「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」という仮説を検証できるほどのデータが得られなかった。要因の一つとして、稚サンゴの生育状況、受精時の卵の発育状況など、高水温以外にも様々な要因が稚サンゴの生残に影響を与えた可能性がある。すなわち、稚サンゴの高水温暴露実験では、稚サンゴの高水温耐性を正しく検証できていない可能性がある。

一方、今年度の稚サンゴの高水温暴露実験では、TTAT ホモ同士の組合せにおいて、稚サンゴの生残率が高くなる傾向がみられた。このことから、TTAT ホモが高水温耐性と関係ないとは現時点では結論付けられない。さらに多くの成体のサンゴを用いた高水温暴露実験での検証が必要であると考えられる。

2.3 今後の展望

今年度行った稚サンゴの高水温暴露実験の SNP 型解析だけで、TTAT ホモが高水温耐性と関係ないとは現時点では結論付けられない。そこで、来年度は以下の検証を行う必要があると考えられる。

①親サンゴ用いた検証

2018年の親群体の高水温耐性の有無の確認実験のように、さらに多くの親サンゴ（天然の成熟群体）を用いた高水温暴露実験を行い、TTAT ホモと高水温耐性の関係についての検証が必要だと考えられる。

②稚サンゴを用いた検証

2019年に作成された沖ノ鳥島由来の稚サンゴは、9群体の卵と精子を混ぜて作成された。それらを高水温暴露前に50群体ランダムに採捕したサンプルのSNP型の特定を本年度行った。暴露後に生き残ったサンゴをランダムに同程度の群体数からSNP型を特定し、高水温暴露前後でTTATホモの群体の割合が変化するか確認する。

3 従来法による高水温耐性サンゴの育種

3.1 高水温選抜サンゴの高水温耐性維持の確認

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2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3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。

(1) 方法

2019年に種苗生産し、0歳齢および1歳齢、2歳齢の時点での高水温暴露実験で生残したウスエダミドリイシ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、海域飼育を開始した。本年度の飼育条件は以下の通りであった(図-VIII.3)。

- | | |
|---------------------------------|------|
| ①水槽内にて高水温で飼育(31.5℃、7月29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(7月22日開始) | 17群体 |
| ③水槽内において通常継続飼育(夏期は飼育海水を28℃に冷却) | 15群体 |

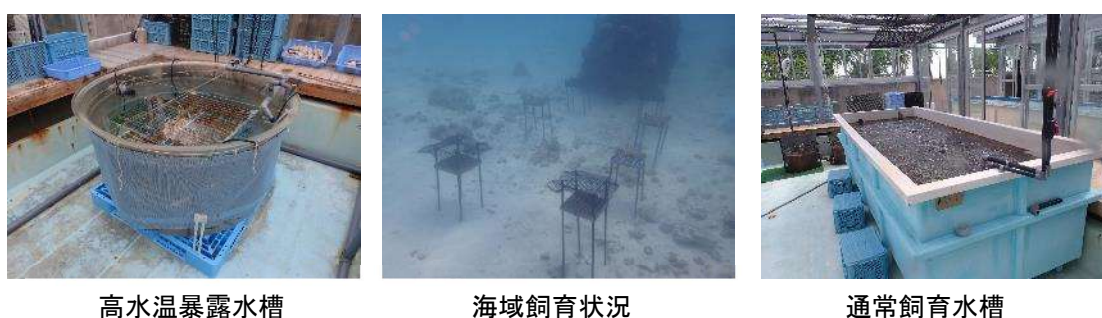


図-VIII.3
高水温選抜サンゴの
異なる飼育条件下で
の飼育状況および
海域飼育地点

(2) 結果および考察

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-VIII.7に示す。3つの飼育条件間において統計的に有意差なかった(Fisher's Exact Test, $p=0.7973$)。このことから、0歳齢で高水温耐性を維持しており、また野外環境にも適応可能であったと考えられる。また、2022年の夏期に海域にて高水温が発生し、7月23日～8月29日の海域飼育地点の平均水温は31.0℃に達し、周辺の天然サンゴは白化したにもかかわらず、海域飼育のサンゴのほとんどが生残したことである。このことから、高水温で選抜したサンゴは、高水温耐性を持っていることが検証されたと考えられる。

表-Ⅷ.7 異なる飼育条件下における高水温選抜サンゴの生残

	実験開始時	実験終了時
	2021年7月	2022年9月
	群体数（生残率%）	群体数（生残率%）
水槽内高水温	10（100%）	6（60.0%）
海域飼育	17（100%）	16（94.1%）
水槽内常温	15（100%）	13（86.7%）

3.2 高水温耐性サンゴの飼育環境の把握

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ことを検証している。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2022年3月までの生残サンゴ数および生残率は、それぞれ64群、80.0%であった。

(1) 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。

(2) 結果および考察

2023年1月4日時点での生残サンゴ数は58群体で、本年度における生残率は90.6%であった。過年度の飼育における生残率と比較すると高い生残率であった。本年度においては6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。

成長に関しては、ほとんどの群体が直径12cmを超えており（42か月齢）、成長の良い群体では直径20cmを超えている。これらの大型の群体のうち10群体程度が、2022年5月に産卵を行った。

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。