

2012. 4

特集号



(題字：脇口宏学長)

国立大学法人
高知大学学報

高知大学学位授与記録第五十三号

法人企画課広報戦略室発行

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、高知大学学位規則第14条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

 *
 *
 *
 *
 *

高知大学学報

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
甲総黒博第3号	エルビラ ポール ELVIRA PAUL ロメール ROMMEL ベラスコ VELASCO	Cytomorphogenesis in <i>Valonia</i> (Siphonocladales, Chlorophyceae) : Ultrastructural and Biochemical Studies on Cell Regeneration and Rhizoid Differentiation パロニア属植物（緑藻綱，ミドリゲ目）の細胞形態形成：細胞再生と仮根分化に関する微細形態学および生化学的研究	1
甲総黒博第4号	スパルノ SOEPARNO	Study on the ecology of juveniles of coral reef fishes using otolith increments 耳石日周輪を用いたサンゴ礁魚類の生態に関する研究	10
甲総黒博第5号	キャウタウィ KEAWTAWEE テイヤポーン TEEYAPORN	Microbiological Studies on the Stable Shrimp Aqua-culture with Special Reference to the Suppression of Noxious Plankton 有害プランクトン抑制に着目したエビ増養殖の安定化に関する微生物学的研究	15

ふりがな 氏名（本籍） 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目 発表誌名	エルビラ ポール ロメール ベラスコ ELVIRA PAUL ROMMEL VELASCO (フィリピン) 博士 (学術) 甲総黒博第3号 学位規則第4条第1項該当 平成24年3月23日 Cytomorphogenesis in <i>Valonia</i> (Siphonocladales, Chlorophyceae): Ultrastructural and Biochemical Studies on Cell Regeneration and Rhizoid Differentiation (パロニア属植物 (緑藻綱, ミドリゲ目) の細胞 形態形成: 細胞再生と仮根分化に関する微細形態学および生化学的研究) Elvira PR, Sekida S, Okuda K, 2011. Rhizoid formation in <i>Valonia</i> (Siphonocladales, Chlorophyceae). <i>Phycologia</i> (in press) Elvira PR, Okuda K, 2011. Cytoskeletal and Ultrastructural Studies on Regenerating Cells from the Protoplasts of <i>Valonia</i> (Siphonocla les, Chlorophyceae). <i>Kuroshio Science</i> 5-1:39-49 <div style="text-align: center;"> 審査委員 主査 教授 奥田 一雄 副査 准教授 関田 諭子 副査 准教授 久保田 賢 副査 (外部審査委員) 諸岡 慶昇 副査 (外部審査委員) Bonifacio F. Cayabyab </div>
--	--

論文の内容の要旨

The genus *Valonia* (Siphonocladales, Chlorophyceae) is composed of marine algal species possessing large, spherical to clavate, green, coenocytic cell clusters attached to the substrata by numerous rhizoids. *Valonia* is a macroalga displaying basic properties of multicellularity achieved through cytomorphogenesis [(Greek *cyto* (=cell) + *morphi* (=shape) + *genesis* (=creation)] and differentiation of specialized parts such as reproductive, branch and rhizoid cells, which enable it to effectively colonize, and proliferate in, its benthic environment. These cellular processes are of utmost importance in understanding plant cell growth and development. Properly describing macroscopic changes that constitute growth and development necessitates microscopic investigations at the cellular level. Through such an approach, the role of the interconnectivity and interactions among cellular components, including the wall, membrane, cytoskeleton and organelles, in defining cell function and form can be elucidated. Due to the large size and conspicuous branch and rhizoid cell formation stages in *Valonia*, the use of this genus in these methods of investigation is highly advantageous.

This research utilized *Valonia* to investigate the regeneration of cells from protoplasts, induction of rhizoid formation, and differentiation of rhizoids,

論文の内容の要旨

to demonstrate cytomorphological properties that are relevant in maintaining cell integrity and sustaining growth in varying conditions inherent to marine environments. The aim of this thesis is to identify and describe the ultrastructural and biochemical mechanisms facilitating cytomorphogenetic processes involved in cell regeneration from protoplasts and rhizoid differentiation with emphasis on the role of environmental physicochemical conditions. The strategy of this project is based on the employment of environmental stimuli to activate cellular changes across three species of *Valonia*: *V. macrophysa*, *V. fastigiata* and *V. aegagropila*. These cellular changes were described through various biochemical, staining and microscopy techniques. A series of culture studies led to a preliminary assessment of pertinent morphological properties of the three species exploited in the succeeding studies. Cell regeneration from protoplasts was evaluated as a method of propagation with gainful application in later rhizoid differentiation experiments that required numerous cell samples. The process of rhizoid differentiation was then monitored starting from rhizoid induction, rhizoid elongation, and up to rhizoid attachment to a substratum. As a result, the following findings were obtained:

1. Culture Studies in Three Species of *Valonia*

In the first study, observations on the different life stages revealed common and unique characteristics among the three species of *Valonia* that proved relevant in their identification. A common trait that was confirmed was wound healing and cell regeneration from protoplasts, investigated further in detail in the next chapter. A correlation among the unique traits such as cell shape, rhizoid and tenacular cell (a rhizoid-like structure) formation was suggested. This correlation led to the determination and comparison of the properties of rhizoids and tenacular cells in a later study. As a consequence, this chapter suggested the possibility of exploring the use of cytomorphogenetic information in explaining the rationale behind the current species concepts in *Valonia*.

2. Cytoskeletal and Ultrastructural Studies on Regenerating Cells from the Protoplasts of *Valonia* (Siphonocladales, Chlorophyceae)

In the second study, a detailed description of the various ultrastructural

論文の内容の要旨

modifications during cell regeneration from protoplasts was obtained. The organellar, cytoplasmic, cytoskeletal and wall modifications in *V. macrophysa*, *V. fastigiata* and *V. aegagropila* were connected to the changes in morphology of protoplasts. The following major points were thereby found:

(1) a polysaccharide matrix provided the initial covering of the protoplasts, (2) a concurrent rearrangement of cortical microtubules (CMTs) and actin filaments (AFs) facilitated the contraction, distribution and shape transformation of the protoplasm and (3) a rapid construction of the plasma membrane and cell wall completed the regeneration of the cell from the protoplast. These stages ensured the integrity and survival of the fragmented protoplasts during extrusion of the protoplasm after mechanical wounding, a common occurrence in the rough environment of macroalgae such as *Valonia*. As mentioned, this capability found an application as a rapid method of propagation for other experiments on *Valonia* requiring young, numerous cells.

3. Rhizoid Formation in *Valonia* (Siphonocladales, Chlorophyceae)

In the third study, the various mechanisms governing the initiation of rhizoid formation in *Valonia* was enumerated. It was found that rhizoids can be induced on any area of the cell, not just around basal regions where they usually form. Moreover, the following important aspects of induction of rhizoid formation were ascertained: (1) hydrophobic substrata, and not hydrophilic substrata, induced rhizoid formation, (2) in order for rhizoids to form between two cells, the distance between the cell surfaces must be within 0.5 mm (3) the contactless exposure between two cells must last for more than 48 hours for rhizoids to be induced to form, (4) amorphous materials, mainly composed of sugars, must accumulate on the target cell surface and not be easily dissolved on the substratum surface, (5) rearrangement of CMTs may define the area where rhizoid formation occurs, (6) AFs facilitated the movement and accumulation of protoplasmic materials through protoplasmic streaming toward the area of interest, and (7) after the above requirements were satisfied, the cell wall

論文の内容の要旨

swelled and the protoplasmic mass was separated from the mother cell by a septum, resulting in a nascent lenticular cell that extends via tip growth and eventually attaches onto a substratum surface. Aside from these findings, an important implication was inferred regarding *Valonia* and related macroalgae that develop into reticulate thalli since these algae feature rhizoid-like structures called tenaculae. Tenaculae form between two adjacent thallus cell surfaces and may have the same induction mechanisms as rhizoids. This can be considered as a fine example wherein cellular studies may be used to explain the overall morphology of macroalgae, such as *Valonia*, that should be helpful when settling species identity.

5. Effect of Substratum Hardness on *Valonia* Rhizoid Differentiation

In the fifth study, the events comprising rhizoid attachment to substrata, which represent the completion of the rhizoid formation process after induction and elongation, were illustrated in *V. aegagropila*. These involved branching and formation of attachment structures called 'haptera.' Various substratum properties affect the behavior of rhizoids of macroalgae; however, substratum surface energy has been reported to play a major role during rhizoid attachment. This study explored this phenomenon by building a case for isolating the effects of substratum surface energy through hydrophobicity and hardness. In doing so, the following results were obtained: (1) substratum hydrophobicity did not determine the form of rod-shaped and rosette-shaped rhizoids, (2) soft substrata promoted rod-shaped rhizoids while hard substrata supported rosette-shaped rhizoids, (3) increasing hardness, even in a hydrophilic substratum such as agar, induced increasing degrees of tip branching in elongating rhizoids, (4) tip branching in agar could have been influenced by the puncture resistance of agar surfaces against the protruding, relatively softer, cell wall of the rhizoid domed-tip, (5) apart from the cell wall, CMTs may regulate the shape modifications along the tip region of rhizoids. These

論文の内容の要旨

results suggested that in the marine environment, *Valonia* and related macroalgae may utilize rhizoid branching on substrata with varying hardness and adhesion on hydrophobic surfaces.

The dominant connection among the studies comes from the sequence of cellular events naturally occurring in *Valonia*. Based from the major results, the following general conclusions regarding cytomorphogenesis in *Valonia* were gained: (1) a range of synchronized rearrangements of cellular components ensures the survival and integrity of wounded cells, (2) cytoskeletons function in multiple capacities during wound healing and rhizoid formation, (3) the cell wall and extracellular amorphous material serve as one of the cell's means of interaction with the external physical environment, and (4) the lineage of nascent rhizoid cells does not predict their fate as various environmental stimuli can direct the growth mode of rhizoids. In summary, this thesis have successfully revealed multiple cytomorphological characteristics in *Valonia* through the modification of natural environmental parameters and subjecting cells to such conditions while extracting ultrastructural and biochemical information and relating these information to the overall multicellular morphology of *Valonia*.

論文審査の結果の要旨

一般に、高等植物は約 40 の異なるタイプの細胞からなる。これらの細胞は分裂、成長を含む一連の発生・形態形成を通じて形態的かつ機能的に分化する。細胞の発生・形態形成の過程は、その植物の遺伝的プログラムに制御されるだけでなく、自然界の様々な外的環境要因によっても調節される。細胞の発生・形態形成のメカニズムを明らかにすることは、植物科学のもっとも重要な研究課題の 1 つである。

バロニア属の種は緑藻綱ミドリゲ目バロニア科に属する海藻で、熱帯域から亜熱帯域の沿岸に広く分布している。藻体は単一または数 10 個までの巨大な多核細胞から構成され、藻体下部の細胞から生じる多数の仮根によって岩に固着する。申請者は、土佐湾とフィリピン沿岸で採集したバロニア属 3 種を用い、生理学および細胞生物学的手法を駆使して細胞の再生・成長および仮根の形態形成を明らかにしている。学位論文の中核をなすのは、独自の実験系を開発し、仮根の分化が細胞外へ分泌される多糖類の蓄積によって誘導され、かつ細胞に接近させる材料基質の表面特性に依存するという新知見を得ていること。さらにまた、仮根の成長様式が光の有無によって変換される事実を見だし、植物の細胞分化を理解する上で新たな側面を切り拓いているところである。

学位論文は全体が 7 つの章で組み立てられており、第 1 章の緒言と第 7 章の総合考察・結論を除く 2 章から 6 章が主な研究成果となっている。なお、3 章と 4 章は、申請者が参考論文として 2 報の学会誌等掲載論文の内容であり、5 章の内容は、本学位論文の提出後に学会誌への掲載が受理された論文を踏まえて記載されている。それぞれの章の内容は概略以下の通りである。

緒言では、研究の背景、バロニア属植物の特徴、研究目的、何をどこまで明らかにするかについて、用いる手法を含めて詳細に解説している。

バロニア属 3 種における培養研究

採集地の異なる *Valonia macrophyssa* (高知県横浪半島沿岸)、*V. fascigiata* (高知県大月町沿岸)、*V. aegagropila* (フィリピン・ルソン島カガヤン州サンタアナ) から分離した生殖細胞を培養し、それぞれの種における細胞の形、枝細胞の出方、細胞間を繋ぐ接着細胞の有無と形、仮根の形成部位と数、傷害に対する再生能力等の特徴を、野外採集個体の形態と比較しながら、明らかにしている。培養実験では、3 種ともに仮根はガラス製の培養容器の内側に接している細胞の下部から発出すること、また、接着細胞の存在が *V. fascigiata* の分類形質として記載されているが、*V. fascigiata* だけではなく他の 2 種も隣り合う細胞間に接着細胞 (tenaculae) が形成され、その形態が仮根と類似するという結果を得ている。細胞の切断という傷害に対し、3 種ともに細胞が治癒・再生することを観察している。これらの培養実験の結果から、以下の章で扱われる細胞の再生と仮根形成を解析するための基本的な実験系を確立している。

論文審査の結果の要旨

プロトプラストから再生するバロニア細胞における細胞骨格と微細構造

バロニア属3種において、切断した細胞から培地中へ絞り出した原形質は収縮して球形のプロトプラストになり、そのプロトプラストは細胞壁を形成して新しい細胞に再生する。このような傷害治癒と細胞再生の過程における原形質体の形の変化、微小管とアクチンフィラメントの挙動、細胞壁形成を間接蛍光抗体法と超薄切片法による電子顕微鏡観察により明らかにしている。絞り出された原形質は多糖類を含むマトリックスに包まれたまま収縮し、プロトプラストになること、原形質の収縮は細胞表層微小管の脱重合と束化したアクチンフィラメントの出現に随伴すること、球形のプロトプラストになるとアクチンフィラメントが消失し、微小管が際重合して細胞壁形成が始まるという結果を得ている。各種の微小管破壊剤とアクチンフィラメント脱重合剤の効果から、微小管は原形質の収縮運動に影響しないが、再生細胞の細胞小器官の分布に関係するのに対し、アクチンフィラメントは原形質の収縮運動に関与し、かつ再生細胞の生存に不可欠であると考察している。プロトプラストから多数の再生単細胞（無仮根）を得る方法は、仮根の誘導および分化・形態形成のための研究に活用されている。

バロニア属植物の仮根形成

バロニア属植物の仮根は母細胞の任意の部位で形成（細胞分裂）するレンズ状細胞が細く伸長して発達する。仮根形成が母細胞のどの部位で起こるのか、仮根形成を誘導する外的環境要因や物質が存在するのか、誘導後に起こる仮根形成の過程などを、それぞれ各種の基質材料、組織染色と蛍光標識レクチン、間接蛍光抗体法を用いて明らかにし、以下の主な結果を得ている。細胞表面に各種の基質材料を接触させると、ガラス等の疎水性基質と接触している細胞表面部位で仮根形成が誘導され、寒天等の親水性基質との接触では仮根形成は誘導されなかった。互いに接触させた2つの細胞の接触面でも仮根形成が誘導されたが、仮根形成は必ずしも両細胞の接触を必要とせず、細胞間の距離が0.5 mm以内であれば、仮根形成が誘導された。仮根誘導が成立するために両細胞を接触または近接させる時間は少なくとも48時間が必要であった。両細胞の接触部の周辺および近接部位に不定形物質が蓄積したが、不定形物質を除去すると仮根が誘導される割合が減少した。不定形物質は細胞表面全体に渡って分泌される多糖類であり、 β -D-glucose, α -D-mannose, β -D-galactose, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-glucosamine 残基を含むことが示唆された。仮根形成が誘導されると、その部位の細胞表層微小管の配列がランダムとなり、アクチンフィラメントの収縮により周辺の原形質が集合した。集合した原形質は、それと母細胞の原形質を分割する隔壁が形成されることにより、小さなレンズ状細胞に分裂した。

論文審査の結果の要旨

レンズ状細胞の頂部が突出・伸長して仮根が発達した。これらの結果から、細胞は細胞表面全体に分泌される多糖類が蓄積する部位に疎水性基質が存在することを感受し、感受した刺激がその部位の細胞領域に伝えられ、細胞骨格が関与する原形質の集合とレンズ状細胞の分裂、仮根形成という応答が導かれると考察している。また、バロニア細胞におけるこのような仮根形成の誘導メカニズムは、細胞同士が *tenaculae* で結合するアミモウやアオモグサなどの他のミドリゲ目多核緑藻の形態形成にも重要な役割を果たしていると推察している。

人為的に誘導できる成長様式の変換はバロニアの仮根分化に影響を及ぼす

細胞・組織が特異的な構造、機能、遺伝子発現を示す状態に変化することを分化と呼び、また一般に、分化は不可逆のプロセスである。バロニア属植物の仮根は、拡大成長する卵形の大型細胞から分裂し、先端成長する糸状体に発達するので、仮根形成は細胞分化であると同時に形態形成であるとみなせる。発生初期の仮根が外的環境にどのように反応するかを *V. aegagropila* を用いて調べ、仮根形態と成長特性に影響を及ぼす種々の環境要因が存在することを明らかにし、概要以下の結果を得ている。水中または軟らかい基質中で、また、暗黒条件下でも仮根は先端成長を継続する。先端成長している仮根に $10 \text{ mmol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上の強度の光を照射すると、先端成長が阻害され、先端のすぐ下部が拡大成長に変換し、球形に膨張した。光照射のもとで拡大成長する仮根を暗黒条件に移すと、以前に成長していた先端部で先端成長が再開した。このような成長様式の変換は光条件や基質を調整することで可逆的に何度でも制御でき、その結果、一本の串にいくつかの団子が連なったような形態の仮根になった。光合成電子伝達系の阻害実験により、光合成のような光依存過程が成長様式の変換に関与することが示唆された。仮根に拡大成長を継続させることによって大きく発達する膨張部は、形態的および機能的に卵形の大型細胞と同様に、レンズ状細胞形成によって新たな仮根を形成した。これらの結果から、バロニアにおける先端成長中の仮根は、その形態と機能において予め既定されておらず、分化が成立した状態に達する途中段階にあると考察している。無傷の細胞で成長様式が変換して細胞の構造・機能が変化する事実は植物では最初の知見であり、細胞の運命を決める分化のプロセスを理解する上で新しい認識をもたらしている。

バロニア属植物の仮根分化に関する基質の堅さの効果

上記の研究では、仮根の成長に焦点が当てられたが、仮根の主たる役割は基物への付着である。仮根が仮根として分化していることを示す特異的機能が果たされるのは、最終的に基物に付着することである。ここでは、*V. aegagropila* を用い、仮根が付着する基物の表面エネルギー（疎水性能と堅さ）の影響と効果を明らかにしている。仮根が基物に付着するとき、仮根先端が分岐し、いわゆるロゼット状の付着器 (*haptera*) の形態を形成するが、基物に付着しないときは、仮根は先端成長を続ける。基物として種々の基質材料を用い、概ね以下の結果を得ている。基質の疎水性能は先端成長の継続か付着器形成かの決定に関係しなかった。しかし、その決定は基質の堅さに関係し、軟質基質では先端成長が継続したのに対し、硬質基質は寒天のような親水性物質であっても付着器形成を誘導した。基質として用いる寒天の濃度の増加に伴い、付着器の分岐が増加

論文審査の結果の要旨

したが、これは寒天内に穿孔する仮根先端の細胞壁強度に対する寒天の破碎耐性の程度に依存した。先端成長する仮根の細胞表層微小管は仮根の軸に平行に配列して先端に収斂したが、仮根が基物に付着し、仮根先端が複数の分岐をもつ付着器に発達するとき、平行配列する表層微小管は複数の束になって付着器のそれぞれの分岐の先端に収斂した。これらの結果から、仮根の先端部は接触する基物の堅さを認識し、その刺激を感受すると、仮根先端の表層微小管の収斂部が分割し、付着器の分岐を形成するという応答に至ると考察している。このような仮根の付着器形成メカニズムは、仮根が本体細胞または藻体を支えるに足る固い基物に到達して初めて付着器を発達させるという藻類の生態的適応に役に立っていると推察している。

最終章の総合考察では、細胞の形態形成と分化を研究するためのモデル生物としてのバロニア属植物の有効性を検討し、実験材料として用いたバロニア属3種の生殖・発生・形態形成を含む生活史を明らかにする中で、仮根形成を研究の焦点に絞った根拠を説明して本学位論文の植物科学における位置づけをまず明確にし、その上で、成果の中心をなす細胞再生および仮根の分化と形態形成に関する研究結果に詳細な考察を加え、最後に今後の研究課題について具体的に言及している。

本学位論文は、バロニア属植物の仮根形成の始まりから終わりまでを、形成誘導、成長、付着器形成の3つの連続する異なる素過程に区別し、各素過程における外的環境要因とそれらによる刺激の感受および細胞応答を細胞生物学的・細胞生理学的に明らかにしている。特に、仮根形成誘導は母細胞が細胞表面全体に分泌している多糖類物質の局所的な蓄積によって起こる事実、発達中の仮根が光条件に依存して成長様式を変換し、細胞分化の方向を変える事実、さらに仮根の先端が基物の堅さを認識して付着器を形成し、最終的にその機能を果たす仮根に確定分化する事実を見いだしたことは、申請者の高いオリジナリティーを示すものであり、植物の分化と細胞の運命がどのように調節されているかを解明する植物細胞学の研究に大きく貢献し、学位論文の核心部分として高く評価できる。また、本研究で明らかにされたバロニア属植物の仮根がもつ種々の生理学的特性を基礎にし、自然界で大型藻類が仮根を形成して岩上に着生するしくみを細胞レベルで説明することが可能となることから、本学位論文は、沿岸植生とその生態系を研究の範疇とする黒潮圏科学にも密接に関連する内容を含むと考えられる。

<p>ふりがな 氏名（本籍） 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目</p> <p>発表誌名</p>	<p>スパルノ SOEPARNO（インドネシア） 博士（学術） 甲総黒博第4号 学位規則第4条第1項該当 平成24年3月23日 Study on the ecology of juveniles of coral reef fishes using otolith increments. (耳石日周輪を用いたサンゴ礁魚類の生態に関する研究)</p> <p>Relationship between pelagic larval duration and abundance of tropical fishes on temperate coasts of Japan. Soeparuno, T. Shibuno and K. Yamaoka, Journal of Fish Biology (投稿中、一志査読が終わり現在二次査読中)</p> <p>審査委員 主査 教授 山岡 耕作 副査 教授 木下 泉 副査 教授 大谷 和弘 副査 (外部審査委員) Victor S. Soliman</p>
<p>論文の内容の要旨</p>	
<p>Study on the ecology of juvenile of coral reef fishes on subtropical (Ishigaki-Iriomote Islands) and temperate habitat (Shikoku Island) consist of 3 study part: (1) Relationship between pelagic larval duration and abundance of tropical fishes on temperate coasts of Japan, (2) Settlement size and age of coral reef fishes in subtropical and temperate costs of Japan and (3) Recruitment patterns of coral reef fishes between coral dominated and rocky reef at Shikoku Island.</p> <p>Objectives : (1) to examine how pelagic larval duration and egg type dispersal capabilities of tropical fishes influence the abundance of tropical fishes on the temperate habitat, (2) to compare settlement size and age of coral reef fishes where settle on both subtropical dan temperate habitat, and (3) to determine colonization patterns of fishes on reef and to examine its habitat preference (coral/rocky).</p> <p>Methods : Larvae were collected at Ishigaki-Iriomote Islands, between May-August 2006-2009 and at Shikoku Island between May-September 2009-2011 using light traps, then identified to the lowest taxonomic and measured the standard length. Lapilli otoliths were used to estimate PLD for each species. Type of habitat preference of reef fish recorded at laboratory choice experiments (Study 3). For study (1), the abundance of reef fishes was investigated by underwater visual transect-survey at Kashiwajima, Yokonami, and Tei on Kochi-coast. Thirty-five species of 7 families (Apogonidae, Pomacentridae, Chaetodontidae, Lethrinidae, Lutjanidae, Mullidae, and Acanthuridae), were selected based on their egg types (i.e., pelagic and demersal spawners), and then categorized further into common and rare species based on their individual numbers.</p> <p>Results : Study (1), PLDs of pelagic spawners were significantly longer than those of demersal spawners and</p>	

論文内容の要旨

high occurrence of pelagic spawners on the Kochi coasts shows that pelagic spawners are more easily transported to the temperate coasts than demersal spawners. For the demersal spawners, a common species group had a significantly longer PLD than a rare species group. Therefore, length of PLD is probably an important factor for the distribution of demersal spawners. Moreover, a negative correlation between PLD and the abundance in some species of pelagic and demersal spawners suggest the presence of reproductively active fishes in northern subtropical and even in temperate waters. For study (2) and (3), at least 13 species of six families were collected and further analysis still going on process.

論文審査の結果の要旨

学位申請者 Soeparno 氏の申請論文: *Study on ecology of juveniles of coral reef fishes using otolith increments* は、黒潮により沖縄等の南方海域から高知県等温帯域に運ばれて来と考えられるサンゴ礁魚類稚仔魚の加入機構を、主に耳石の礫石(lapillus)に形成される日周輪数から推測された浮遊期間、卵の性質(浮性卵か沈性卵か)、温帯域(高知県)のサンゴ群集域での生息状況(一般的に見られるか: **common**, それともまれにしか見られないか: **rare**)を関係づけて、明らかにしようとした研究である。

海流とそれによるサンゴ礁魚類の温帯域への移送に関する研究は、オーストラリアのグレートバリアリーフ(Booth et al., 2007)やアメリカ合衆国東岸域(McBride and Able, 1998)等で行われてきた。しかし、これらの研究では、加入した稚仔魚の日齢のみを調査し、それ以上の分析は全く行っていない。また、高知市近郊の高知県横浪林海実験所では、チョウチヨウウオ科稚魚を中心に、黒潮により南方より運ばれてきたと推測される136種が報告されている(平田他、2011)。これらの現状及び加入メカニズムを把握し明らかにする事は、今後益々強まる事が予測される地球温暖化とそれに伴う海水温の上昇が、温帯域に位置する我国の沿岸魚類相に、どのように影響を与えるかを考察する際の貴重な基礎的知見になるものと考えられる。

本論分は以下の3章から構成される。

- 1: Relationship between pelagic larval duration and abundance of tropical fishes on temperate coasts of Japan.
- 2: Comparison of pelagic larval duration of tropical fishes between Okinawa and Kochi.
- 3: Habitat choice and recruitment of tropical fishes on temperate coasts of Japan.

第一章は本論分の主要な部分である。サンゴ礁魚類の初期生活史における浮遊期間の長さとお卵の性質(浮遊卵または沈性卵)が、どのように温帯沿岸域の稚仔魚の加入に影響を与えているかを明らかにする事を目的とする。石垣島および西表島の沿岸域にて、夜間にライトトラップにより採集を行い、琉球列島周辺域で一般的に見られる7科35種の着底前仔魚を得た。それらを浮性卵を産む魚種と沈性卵を産む魚種に分け、礫石の日周輪を分析する事により各種の浮遊期間を類推した。採集期間は2006年から2009年の5月から9月の間である。また、高知県のイシサンゴ群集域(柏島、横浪、手結)において、それら35種の生息数をベルトトランセクト法により潜水調査し、一般的 **common** か希 **rare** かを判定した。

礫石の日周輪分析の結果、今回研究に用いた7科35種については、浮性卵を産む魚種の着底

論文審査の結果の要旨

前仔魚の浮遊期間は、沈性卵を産む魚種の浮遊期間よりも有意($P<0.01$)に長い事が明らかとなった。35種の内、高知県沿岸域で観察される浮遊卵性魚種数が20、沈性卵性魚種が15となった。本研究で用いた種に関しては、前者が後者よりも多く温帯域に見られるという結果となり、浮性卵を産む魚種の浮遊期間がより長い事により、温帯域まで到達しやすいという可能性が考えられる。また産卵生態の違いにかかわらず、一般的に見られる魚種の方が希な魚種よりも、浮遊期間は有意に長い事がわかった。基質産卵魚であるスズメダイ科は12種が出現するが、一般的に見られるにもかかわらず浮遊期間の短い種は、琉球列島北部から南九州周辺で成魚が観察される事から、高知から距離的にそう遠くない地域で産卵している可能性が示唆された。沈性卵を産む魚種については、浮遊期間の長さが温帯域での生息域の拡大にとって重要な要因になっている可能性がある。

浮性卵を産む魚種については、フエダイ科とフエフキダイ科では一般的な種が希な種に比べて長い浮遊期間を示した。しかし、チョウチョウウオ科、ヒメジ科、ニザダイ科では逆の傾向がみられた。これらの事より、浮性卵を産む魚種にとっては、浮遊期間は温帯域での分布を決定する主要な要因ではないものと推測される。

第二章は第一章の結果を踏まえて、一つの仮説の検証を目的としたものである。仔魚が石垣島と西表島周辺から土佐湾まで黒潮により運ばれて来ていると仮定すると、沖縄で採れる着底前仔魚よりも土佐湾で採れた個体の方が、浮遊期間が長いはずである、という仮説が設定できる。その傾向が最も顕著に現れるのが沈性卵から生まれた魚種で土佐湾では希な魚種(最も浮遊期間が短いという結果が第一章で得られた)だと考えられるため、その点を明らかにしようとした。リュウキュウヤライイシモチについてのみ調査できたが、両者間に有意差は認められず、後者の方がむしろ浮遊期間が短く体長も小さい傾向を示した。最近になり本種が高知県西部でも産卵している事が確認され、この様な想定外の事実が今回得られた結果を複雑にしていると考えられる。今後、より厳密な意味での本仮説の検証が必要とされる。

第三章は南方から黒潮により夏期に運ばれてきたサンゴ礁魚類着底前仔魚が、どのように温帯沿岸域の生息場に参加するのかを明らかにする事を目的としたものがある。横浪半島と香南市夜須町手結のイシサンゴ群集域と岩礁域それぞれで、ライトトラップによる着底前仔魚採集とベルトトランセクト法による着底稚魚個体数調査を行った。横浪半島と手結における両生息場の直線距離は、それぞれ6 kmと500mである。さらに水槽内での生息場選択の実験を併用し、ライトトラップとベルトトランセクト調査の両者に出現した5科14種を調査対象とした。横浪においては着底前仔魚はサンゴ群集域に、手結では両生息域に集まる傾向を示した。稚魚については、横浪、手結両地点ともサンゴ群集域への加入がみられた。水槽内実験結果によると、トノサマダイ、ミスジチョウチョウウオ、ソラスズメダイの仔魚は、イシサンゴ群体を着底基質として有意に強く選択したのに対

論文審査の結果の要旨

して、ヒメジ科の仲間には選択性はみられなかった。今回の結果は、サンゴ礁魚類仔魚は 500m のスケールでは着底すべき生息場を選択できず、6km の距離では選択できた事を示すものである。サンゴ礁魚類の温帯域への加入機構を明らかにするためには、より生息場間の距離や海洋環境を考慮した更なるフィールド調査が必要とされる。

ふりがな 氏名(本籍)	キャウタウィ ティヤポーン KEAWTATAWEE TEEYAPORN (タイ)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲総黒博第5号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成24年3月23日
学位論文題目	Microbiological Studies on the Stable Shrimp Aquaculture with Special Reference to the Suppression of Noxious Plankton (有害プランクトン抑制に着目したエビ増養殖の安定化に関する微生物学的研究)
発表誌名	-Keawtawee, T., K. Fukami, P. Songsangjinda, and P. Muangyao. 2011. Isolation and characterization of Noctiluca-Killing bacteria from a shrimp aquaculture pond in Thailand. <i>Fisheries Science</i> , 77: 657-664. - Keawtawee, T., K. Fukami, P. Songsangjinda, and P. Muangyao. 2011. Nutrient, phytoplankton and harmful algal blooms in the shrimp culture ponds in Thailand. <i>Kuroshio Science</i> , (accepted)
	審査委員 主査 准教授 田中 壮太 副査 教授 深見 公雄 副査 准教授 伊谷 行

論文の内容の要旨

[Introduction] Shrimp aquaculture is one of the most important fisheries in Asia-Pacific region. The blooming of intensive shrimp culture had promoted Thailand to be the largest shrimp producer and exporter in the world in 2000. However, environmental pollution, depleted water supplies, changes in water salinity, and disease problems soon brought about massive crop failures in coastal areas. Recently, production of shrimp in the southern Thailand during 2010 to 2011, was destroyed by the outbreak of viral and bacterial disease and at least 60×10^3 ton of shrimp production (10,500 million bahts) was lost. In an intensive shrimp aquaculture system, water in shrimp pond is typically enriched with both organic matters and inorganic nutrients often result in enhancement of eutrophication and growth of noxious in shrimp ponds. Blooms of noxious plankton often resulted in increase in shrimp mortality or growth diminution by poisoning, diseases or mucus production effects. *Noctiluca scintillans* is one of noxious plankton occurring in shrimp culture system and affecting on shrimp conditions in many regions. Although this species did not produce a toxin, it was found to accumulate ammonia as much as in toxic levels, and it was then excreted into the surrounding waters, acting as the killing agent in blooms and mass mortality of finfish in farms caused by oxygen depletion, gill clogging and high ammonia

論文の内容の要旨

levels. The occurrence of *Noctiluca* sp. blooming during the middle period of shrimp culture also gave the stress to shrimp and resulted in low production. Therefore, to suppress or control the growth of noxious plankton is an urgent and necessary task. Recently it is known that marine bacteria play important roles in decreasing or developing algal communities and were considered as key biological controllers in the dramatic termination of phytoplankton blooms. Nevertheless, no study mentioned on suppressing and/or controlling noxious plankton *N. scintillans* using the function of some bacteria for improving the production in shrimp aquaculture system. The objectives of the present study are; 1) To investigate the variations of various environmental parameters, including chlorophyll a and the fluctuation and effects of phytoplankton community structure on shrimp growth and production. 2) To isolate and identify algicidal bacteria from shrimp pond water. 3) To clarify the activities of *Noctiluca*-killing bacteria and its effect on others phytoplankton. 4) To investigate the improvement of the shrimp survival rate by suppressing growth of noxious plankton using algicidal bacteria isolated from shrimp pond water. Finally, possibility to use algicidal bacteria for controlling noxious plankton in shrimp culture farms and to improve and give the stable of shrimp aquaculture was discussed.

[Materials and methods] Shrimp culture water samples were collected from a *Penaeus monodon* shrimp culture pond at Domrong shrimp farming, Thepha, Songkhla province, Thailand. The water qualities including physico-chemical parameters, dissolved and particulate matters were measured. The relationships between environmental parameters including community structure of phytoplankton and shrimp production were investigated. Then the natural bacterial abundance in shrimp culture water and the distribution of algicidal (algae-killing) bacteria in shrimp culture pond were observed. Algicidal bacteria were isolated from the shrimp culture water and their activities were studied including the mode of direct attach by cell-to-cell contact or indirect attach by the production of an extracellular product, effect of Temperature on the killing Activity and its Killing effect on Others Phytoplankton. Finally, the most effective killing strain was used for further experiments to improve the survival of two species of the shrimp, *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*.

[Results and discussions] Results of the fluctuation of nutrients indicate that the dissolved nitrogen Concentration in water was lower than that of particulate or dissolved organic nitrogen. The concentrations of chlorophyll a were usually more than $100 \mu\text{g L}^{-1}$ in shrimp ponds. This showed the reverse relationship to the fluctuations of dissolved inorganic nutrient concentration,

which may be attributed to that phytoplankton could take up dissolved nutrients and grew in the pond. The fluctuation of water quality and the relationship between phytoplankton density and shrimp conditions in the shrimp culture pond confirmed our understanding that when the chlorophyll a concentration increased, total food consumption of shrimp decreased and a clear shrimp decline and the worse growth of shrimp by the dinoflagellate. Results indicated that high concentration of chlorophyll a, in particular dinoflagellate, impacted on shrimp physiology as decreasing total food consumption and consequent decrease in shrimp growth and production.

Results of the fluctuation of the abundance of total bacteria and algicidal bacteria in the shrimp culture pond showed significantly higher than those previously reported in coastal areas and indicated that the number of algicidal bacteria was related to the total bacteria count in shrimp culture water. Initial investigations showed the presence of bacteria possessing the killing activities against either of *Skeletonema costatum*, *Heterosigma agashiwo* or *Prorocentrum minimum* in shrimp ponds. The inhibitory activities of killing bacteria varied with plankton species, some bacteria showed species- or genus-specific, while some strains had multi-species inhibitory affects.

Results of *Noctiluca*-killing bacteria isolation showed that about 13 bacterial strains of 260 strain isolation showed killing effects on *N. scintillans*. Among these, a strain BS2, identified as *Marinobacterium salsuginis* (Table 1) which had not yet been recorded as the causative bacteria of shrimp diseases or shrimp mortality, showed the strongest killing activity on *N. scintillans*. Identification revealed that all the stronger *Noctiluca*-killers belonged to Gamma-proteobacteria group. Results of killing activities also showed that *Noctiluca*-killing bacteria must have species-specific killing activities when we applied them to the field for preventing noxious plankton.

Results of using BS2 for suppress *N. scintillans* to improve shrimp survivals (*Penaeus monodon* (Black tiger shrimp) and *Litopenaeus vannamei* (White shrimp)), show that *Marinobacterium salsuginis* strain BS2 could kill *N. scintillans* in shrimp culture within 2 days of inoculation (Fig. 1) and improved shrimp survival in both shrimp species. Survival rates of small size shrimps were improved from 23 % to 87 % in both *P. monodon* and *L. vannamei* (Fig. 2 a and 2 c), and larger *P. monodon* and *L. vannamei* were also improved from 47% to 93% and 87% to 93% (Fig. 2 b and 2 d), respectively. Moreover, the *Noctiluca*-killing bacterial strain BS2 did not influence on the growth and mortality of both shrimp species. The improvement was certainly attributed to the inhibitory effect of strain BS2 on *N. scintillans* growth thereby reducing the worse effects of *N. scintillans* on shrimps

However results of shrimp survival rates were better when DO concentration in the shrimp culture was kept to higher level (Fig. 3 a-b and 3 d-e), ammonia concentrations were not significantly different between SN and SNB treatments, either with or without additional DO, after 7 days of shrimp rearing (Figs. 3 c and 3 f). This study also suggests that the shrimp mortality during blooming of *N. scintillans* in the pond was not due to the increased ammonia

concentration. Although, *N. scintillans* cells was contained high ammonium ion.

These results obtained in this study strongly suggest that algicidal bacteria present in shrimp ponds had ability to improve or recover shrimp survival and to increase the efficiency of shrimp production by suppressing noxious plankton. As mentioned in the first chapter (General Introduction) and the beginning of this chapter, economic loss in shrimp aquaculture by mass mortality due to the lethal effects of noxious plankton was 10,500 million bahts during 2010 to 2011 (Songsangjinda et al., 2011). However, possibility to use algicidal bacteria for controlling noxious plankton in shrimp culture farms and to improve and give the stable shrimp aquaculture will reduce the damage, and we may expect the recovery of around 70 % of shrimp production (ca. 7,350 million bahts). Application of killing bacteria would be promising for the future shrimp aquaculture, and be a major benefit for shrimp farming.

Table 1 The identification and accession number of the DNA data bank of Japan (DDBJ) of the five most effective strains of *Noctiluca*-killing bacteria against growth of *Noctiluca scintillans*.

Number	Strain	16S rRNA identification	Accession number
1	BS2	<i>Marinobacteria salsuginis</i>	AB621951
2	DH1	*	-
3	BH1	<i>Vibrio</i> sp.	AB621954
4	BP4	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	AB621953
5	DP1	<i>Vibrio</i> sp.	AB621952

* No data

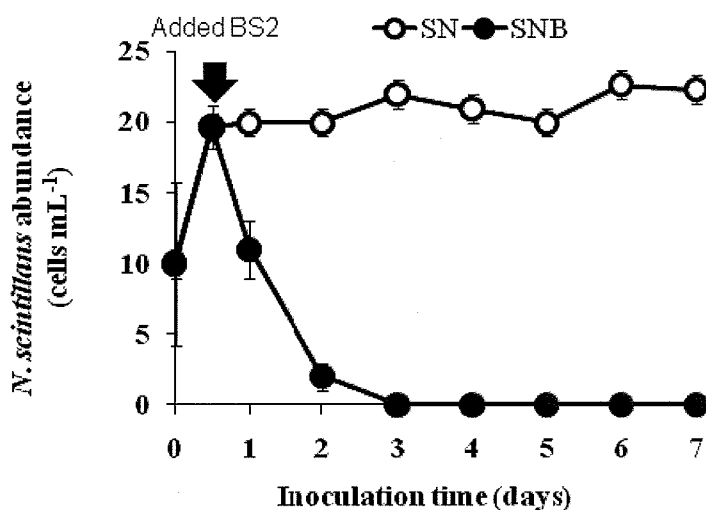


Figure 1. *Noctiluca scintillans* abundance after inoculation of *N. scintillans* and algicidal bacteria strain BS2 in small size of *P. monodon* treatment. (S: shrimp, SNB: Shrimp + *N. scintillans*+ *Noctiluca*-killing bacteria strain BS2). Data are means of replicates with standard deviations.

論文の内容の要旨

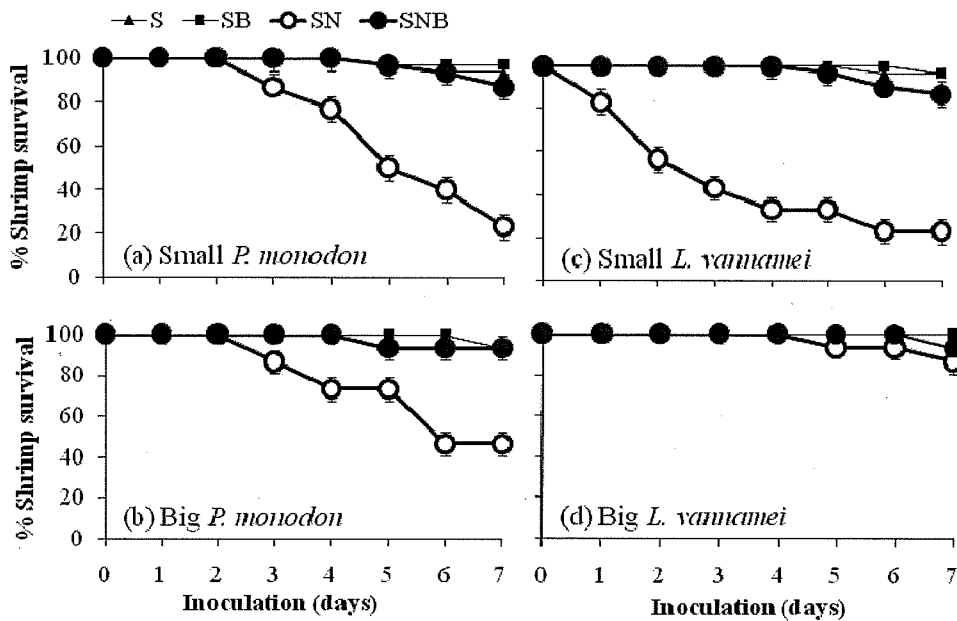


Figure 2. Percentage of *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* shrimp survival after inoculation of *Noctiluca scintillans* and algicidal bacteria strain BS2. (S: shrimp, SB: shrimp+*Noctiluca*-killing bacteria strain BS2, SN: shrimp+ *N. scintillans*, SNB: Shrimp + *N. scintillans*+ *Noctiluca*-killing bacteria strain BS2). Data are means of replicates with standard deviations.

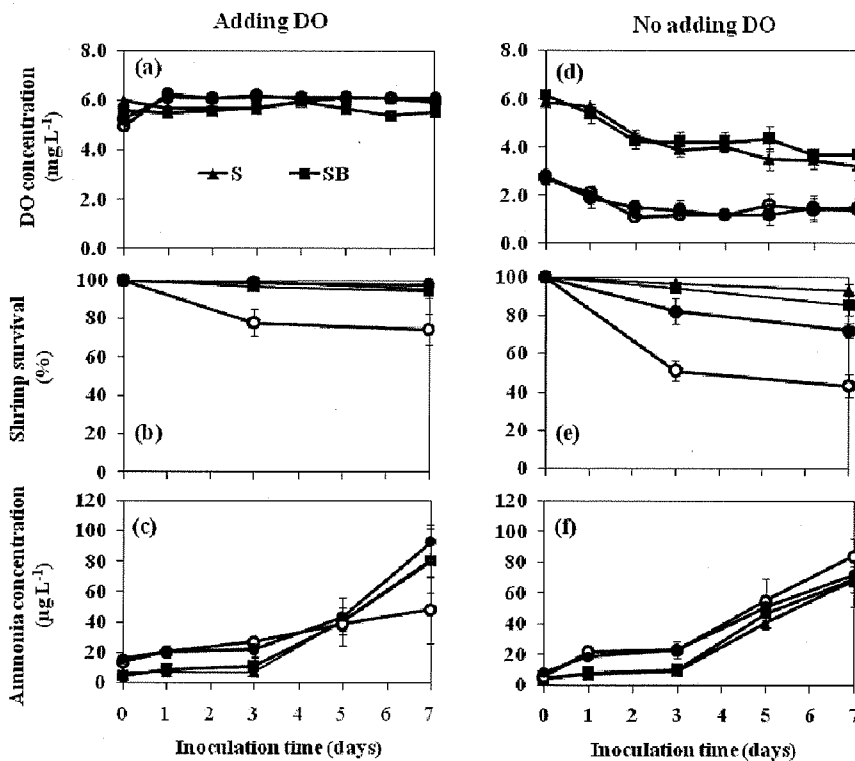


Figure 3. Dissolved oxygen, shrimp survival and ammonia concentration in treatment with adding DO and without adding DO. S: shrimp, SB: shrimp+*Noctiluca*-killing bacteria strain BS2, SN: shrimp+ *N. scintillans*, SNB: Shrimp + *N. scintillans*+ *Noctiluca*-killing bacteria strain BS2. Data are means of replicates with standard deviations.

論文審査の結果の要旨

エビの増養殖は東南アジアの水産業で最も重要なものの一つである。しかしながら近年、高密度なエビ養殖は飼育水圏環境の富栄養化をもたらし、ウィルスや細菌類が原因の疾病発生等による著しい生産量低下が問題となっている。一方で養殖環境の富栄養化は植物プランクトンの大量増殖や有害プランクトンの増殖を引き起こしている。特に *Noctiluca scintillans* (ヤコウチュウ) の大量発生は養殖エビの成長に悪影響をもたらし、大量斃死を招くなど、その生産に多大なる損害を与えていることが世界各地で報告されている。例えばタイ国におけるエビの生産額は、近年やや持ち直してはいるものの、2000年のピーク時の三分の二程度に減少しており、経済的な面からも大きなダメージを受けている。このためエビ養殖池の環境改善、特に *N. scintillans* を初めとした有害プランクトンの発生抑制は喫緊の課題である。

ところで、沿岸海域には有害赤潮プランクトンを殺滅する細菌類(殺藻細菌)が広く分布していることが、これまでの研究で明らかになっている。これらの殺藻細菌は、現場環境中の植物プランクトン群集組成の短期変動に大きな役割を果たしていることが解明されるとともに、分離された殺藻細菌には極めて効率的に有害・有毒プランクトンを殺滅あるいは増殖阻害するものが存在していたことから、殺藻細菌を用いた赤潮防除の可能性についても研究が推進されてきた。しかしながら、エビ養殖池における殺藻細菌の研究はこれまでほとんど行われていない。もし *N. scintillans* の殺滅細菌が現場環境に分布しており、それらが分離され、同藻の増殖を抑制できれば、養殖エビの斃死率を軽減させるなど、東南アジア地域におけるエビの水産増養殖が大きく改善される可能性がある。

そこで本研究では、タイ国南部において、*Penaeus monodon* (ブラックタイガーエビ) および *Litopenaeus vannamei* (バナメイエビ) の養殖が行われている沿岸の汽水養殖池から有害プランクトン、特に *N. scintillans* を殺滅あるいは増殖抑制する細菌類を分離し、*N. scintillans* の増殖に対する影響を明らかにしたうえで、これらの細菌を用いたエビの増養殖の安定化に対する可能性について検討することを目的とした。

その結果、以下の事が明かとなった。

1. タイのエビ養殖池で現場観察を行ったところ、クロロフィル a 濃度が増加するときにはエビの餌量が減少するなど、両者の間には明瞭な負の相関が見られた。特に、現場の植物プランクトン群集において渦鞭毛藻類が優占していた時期あるいは養殖池では、エビの日間成長量が低下するなど、その影響が顕著であることが明かとなった。
2. エビ養殖池の現場試水中に植物プランクトン殺滅細菌が生息するかどうかについて調べた結果、沿岸内湾域と同様、様々な植物プランクトン種に対する増殖阻害細菌が存在していることが明かとなった。
3. 現場試水から細菌株を約 260 株分離し、*N. scintillans* に対する増殖阻害細菌の分離を試みたところ、そのうちの 5 株が強い阻害活性を持っていた。それらの中で、最も強い阻害活性を持っていた BS2 株は接種後 24 時間以内に、*N. scintillans* を完全に殺滅することが分かった。16S rRNA の遺伝子解析の結果、本菌株は *Marinobacter salsuginis* と同定された。
4. BS2 株の *N. scintillans* 殺滅効果は、同株の細菌懸濁液から菌体をろ過除去した培養濾液でも同様に見られた。また BS2 株は *N. scintillans* 以外のプランクトン種(*Heterosigma akashiwo*, *Prorocentrum lima*, *Chatonella antique*, *Chaetoceros ceratosporum*, *Dunaliella* sp.)にはほとんど全く影響を及ぼさないことが明かとなった。このことから、本菌株は、*N. scintillans* に特異的な殺滅効果を保有しており、しかも何らかの殺滅物質を菌体外に生産・分泌していることが分かった。

論文審査の結果の要旨

5. *P. monodon* および *L. vannamei* の養殖稚エビを収容した容器に *N. scintillans* をそれぞれ接種したところ、約 80%のエビ個体が 1 週間以内に死滅し、生存率は約 20%であった。それに対して、BS2 株を接種した容器では、*N. scintillans* の細胞数が急激に減少し、それに伴い両種のエビとも死滅率が激減し、実験開始 1 週間後の生存率はおよそ 90%に保たれていた。
6. しかしながら BS2 株は、*P. monodon*, *L. vannamei* のいずれの種に対しても、全く悪影響を及ぼさないことが明かとなった。
7. *N. scintillans* を接種したエビの生存率に対する溶存酸素(DO)の影響を調べたところ、BS2 株の添加によるエビの斃死率軽減効果は、DO 濃度が 2mgO₂/L と低い条件よりも 5mgO₂/L 程度と十分酸素が存在する条件のほうがより顕著であった。また、しばしば *N. scintillans* によるエビへの悪影響の原因として、*N. scintillans* の細胞内に高濃度に存在するアンモニアが指摘されているが、BS2 株の接種の有無による飼育水中のアンモニア濃度には顕著な差異は見られなかった。

本研究で得られた以上の結果から、*Marinobacter salsuginis* BS2 株のような *N. scintillans* 殺滅細菌を用いることで、*Penaeus monodon* および *Litopenaeus vannamei* の増養殖過程における斃死率を軽減することが可能であり、エビの安定的生産に対して有望であることが明かとなった。

タイ国では、商業的に極めて重要なブラックタイガーエビ (*P. monodon*) の生産量が 2000 年の 307 x 10³ トン(生産額で 90,000 x 10⁶ タイバーツ)をピークに、その後は急激に減少し、2009 年にはわず 6.1 x 10³ トン(同 1,300 x 10⁶ タイバーツ)にまで落ち込んでいる。今後、*N. scintillans* 殺滅細菌 BS2 株のような有用細菌が実際にエビ養殖池等の現場に用いられれば、一種のバイオコントロールとして機することが期待され、東南アジアにおけるエビ増養殖水産業の安定化、ひいては地域経済の安定化貢献することが示唆された。