

博士論文（要約）

太平洋亜熱帯海域窒素循環に果たす
動物プランクトンの窒素排泄の役割

中村賢一

論文の内容の要旨

水圏生物学専攻
平成 28 年度 博士課程進学
氏 名 中 村 賢 一
指導教員名 高 橋 一 生

論文題目 太平洋亜熱帯海域窒素循環に果たす動物プランクトンの
窒素排泄の役割

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内
に出版予定。

目次

第1章 亜熱帯海域動物プランクトンの窒素排泄の役割

- 1.1. 序論
- 1.2. 表層における窒素再生
- 1.3. アクティブフラックス
- 1.4. 尿素排泄による窒素再生

第2章 アンモニア排泄速度測定法の検討

- 2.1. 序論
 - 2.1.1. これまでのアンモニア排泄速度測定手法
 - 2.1.2. 研究目的
- 2.2. 方法
 - 2.2.1. 採集方法
 - 2.2.2. 飼育実験
 - 2.2.3. アンモニア濃度測定
 - 2.2.4. 実験個体の体積および乾燥重量測定
 - 2.2.5. 統計解析
- 2.3. 結果
 - 2.3.1. 容器サイズの影響
 - 2.3.2. 個体密度の影響
 - 2.3.3. 飼育時間の影響
- 2.4. 考察
 - 2.4.1. 容器サイズおよび個体密度の影響
 - 2.4.2. 飼育時間の影響
- 2.5. 結論

第3章 黒潮周辺海域日周鉛直移動性カイアシ類 *Pleuromamma* spp.のアンモニア排泄

- 3.1 序論
 - 3.1.1. アクティブフラックス研究における課題
 - 3.1.2. 西部北太平洋黒潮周辺海域

- 3.1.3. 日周鉛直移動性カイアシ類 *Pleuromamma* 属
- 3.1.4. 研究目的
- 3.2. 方法
 - 3.2.1. 観測概要
 - 3.2.2. 水塊構造、栄養塩およびクロロフィル *a* 濃度
 - 3.2.3. *Pleuromamma* spp.の鉛直分布
 - 3.2.4. *Pleuromamma* spp.のアンモニア排泄速度測定
 - 3.2.5. *Pleuromamma* spp.群集による窒素再生量の推定
- 3.3. 結果
 - 3.3.1. 水塊構造、クロロフィル *a* 濃度、栄養塩
 - 3.3.2. *Pleuromamma* spp.の生物量および鉛直分布
 - 3.3.2.1. 昼夜間における水柱内生物量および種組成
 - 3.3.2.2. 昼夜間における鉛直分布
 - 3.3.3. *Pleuromamma* spp.のアンモニア排泄速度
 - 3.3.4. *Pleuromamma* spp.群集によるアンモニア排泄量の推定
 - 3.3.4.1. 表層窒素再循環への寄与
 - 3.3.4.2. 下層窒素輸送への寄与（アクティブフラックス）
- 3.4. 考察
 - 3.4.1. 水塊構造およびクロロフィル *a* 濃度、栄養塩濃度の季節変動
 - 3.4.2. 表層における *Pleuromamma* spp.の生物量の季節変動
 - 3.4.3. *Pleuromamma* spp.アンモニア排泄速度の季節変動
 - 3.4.4. *Pleuromamma* spp.による窒素輸送および窒素再循環への寄与
- 3.5. 結論

第4章 表層性カイアシ類による窒素再生への寄与

- 4.1. 序論
 - 4.1.1. 表層における窒素再生に関する研究の課題
 - 4.1.2. 研究目的
- 4.2. 方法
 - 4.2.1. 観測概要
 - 4.2.2. 現場環境要因

- 4.2.3. 表層性カイアシ類現存量および生物量
- 4.2.4. アンモニア排泄速度測定
- 4.2.5. 統計解析
- 4.2.6. 表層性カイアシ類群集によるアンモニア態窒素再生量の推定
- 4.3. 結果
 - 4.3.1. 水温、混合層深度
 - 4.3.2. 表層性カイアシ類現存量および生物量
 - 4.3.3. 表層性カイアシ類のアンモニア排泄速度
 - 4.3.4. 表層性カイアシ類群集によるアンモニア態窒素再生量
- 4.4. 考察
 - 4.4.1. 表層性カイアシ類現存量および生物量
 - 4.4.2. 表層性カイアシ類のアンモニア排泄速度
 - 4.4.3. 表層性カイアシ類群集によるアンモニア態窒素再生量
- 4.5. 結論

第5章 亜熱帯海域窒素循環に果たす日周鉛直移動性動物プランクトンの役割

- 5.1. 序論
- 5.2. 方法
 - 5.2.1. 観測概要
 - 5.2.2. 現場環境要因
 - 5.2.3. 日周鉛直移動性動物プランクトン現存量および生物量
 - 5.2.4. アンモニア排泄速度測定
 - 5.2.5. 日周鉛直移動性動物プランクトン群集によるアクティブフラックスの推定
- 5.3. 結果
 - 5.3.1. 現場環境要因
 - 5.3.2. 日周鉛直移動性動物プランクトン現存量および生物量
 - 5.3.3. アンモニア排泄速度
 - 5.3.4. 日周鉛直移動性動物プランクトン群集によるアクティブフラックス
- 5.4. 考察
 - 5.4.1. アンモニア排泄速度
 - 5.4.2. 日周鉛直移動性動物プランクトン群集によるアクティブフラックス

5.5. 結論

第6章 総合考察

7.1. 西部北太平洋における動物プランクトンによる窒素循環への寄与

7.2. 結論

摘要

謝辞

引用文献

図表

第 1 章 亜熱帯海域動物プランクトンの窒素排泄が窒素循環に果たす役割に関する研究

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

第2章 アンモニア排泄速度測定法の検討

2.1. 序論

2.1.1. これまでのアンモニア排泄速度測定手法

動物プランクトンのアンモニア排泄速度測定では、主に Sealed-chamber method (Ikeda et al., 2000) が用いられてきた。本法はろ過海水に実験個体を入れた飼育容器とろ過海水のみの飼育容器（コントロール）を一定時間収容し、両者のアンモニア濃度の差からアンモニア排泄速度を決定する方法である。これまでの研究では、分析機器の検出限界 ($\geq 50 \text{ nM}$) のために、現場環境から大きく離れた条件下での実験により、測定を行っていた。例えば、短時間 (<12 h) での飼育を行うために、小型容器もしくは高い個体数を用いることで、単位容積あたりの個体密度を高めて ($22\text{--}1818 \text{ ind. L}^{-1}$)、検出限界を超えるようにしていた。反対に、個体密度を下げて ($7\text{--}20 \text{ ind. L}^{-1}$) 測定する場合は、検出するために長時間 (12-24 h) の飼育を行わざるを得なかった (Table 1)。このように、飼育時間と個体密度はトレードオフの関係にあり、動物プランクトンはこれら実験条件のストレス下での飼育を余儀なくされていた。このような実験条件が与えるアンモニア排泄速度への影響は、飼育時間および個体数について、これまでいくつか研究例があり、その影響は種によって異なるものの、無視できないものとされてきた (Le Borgne 1986)。例えば、Nival et al. (1974) による実験では、*Temora stylifera* において、個体密度が 200 ind. mL^{-1} を超えるとき、アンモニア排泄速度の増加が観察された。また、容器サイズによって代謝が変化させることが Zeiss (1963) によって報告されており、*Calanus finmarchicus* 小さい容器において飼育した際、大きい個体よりも呼吸速度が高くなることが知られている。しかしながら、アンモニア排泄速度については容器サイズの影響は明らかとなっていない。長時間飼育については、飼育時間の経過に伴う飢餓状態により、アンモニア排泄速度が低下することが知られている (Skjoldal et al., 1984)。

近年、アンモニア濃度測定における高感度分析法の開発が進み、ナノモルレベル ($\leq 10 \text{ nM}$) での測定が可能となっている (e.g. Hashihama et al., 2015; Kodama et al., 2015a; Whitehouse, 1997)。高感度法により、低密度かつ短時間でのより自然環境に近い条件での飼育が可能となり (Fig. 1)、いくつかの先行研究において、動物プランクトンの排泄速度測定での応用が行われている (Atkinson and Whitehouse, 2001; Kodama et al., 2015b)。

2.1.2. 研究目的

前述の通り、高感度法を用いたアンモニア排泄速度測定法では、これまでの方法に比べ、

低密度かつ短時間でのより自然環境に近い条件での飼育が期待されるが、その有用性については、未だ適切な検証がなされていない。そこで、本研究では採集される動物プランクトン群集において常に優占するカイアシ類に着目し、その排泄速度に与える容器サイズ、個体密度、飼育時間の影響について、高感度分析法を用いて検証することを目的とした。さらに、これまでの手法における実験的誤差を明らかにし、カイアシ類排泄速度測定における高感度法の優位点を議論する。

2.2. 方法

2.2.1. 採集方法

カイアシ類 7 種 (*Calanus sinicus*, *Eucalanus californicus*, *Metridia pacifica*, *Pleuromamma abdominalis*, *Pleuromamma gracilis*, *Acartia steueri*, *Oithona oculata*) を日本およびアメリカ合衆国近海の 8 箇所より実験対象種として採集した (Table 3)。採集は、大型飼育ネット (目合い 100 μm 、口径 80 cm、3 L コッドエンド) を用いて、研究船より鉛直曳き (深度 0-100 m、曳網速度 0.2 m s^{-1}) によって行った。ただし、小型カイアシ類 2 種 (*A. steueri*, *O. oculata*) については飼育ネット (目合い 100 μm 、口径 45 cm、1 L コッドエンド) を用いて、岸壁より傾斜曳き (深度 0-5 m、曳網速度 0.2 m s^{-1}) によって行った。採集した動物プランクトンはクーラーボックスに収容し、実験室での選別まで現場海水中で保存した。また、飼育実験用に船底から汲み上げた研究用海水から、 $<0.2 \mu\text{m}$ ろ過海水を作成した。 $<0.2 \mu\text{m}$ ろ過海水を塩酸洗浄した飼育容器に満たし、飼育実験開始まで温度を表層水温に調節したインキュベーター内で保存した。このとき、相模湾にて採集を行った *C. sinicus*, *A. steueri*, *O. oculata* の実験については、現場海水中のアンモニア濃度が高いことから、アンモニア測定時のバックグラウンドを下げ、ダイナミックレンジ内で検出できるよう、事前に亜熱帯海域 (23°N, 137°E) で採水した海水を用いた。

2.2.2. 飼育実験

容器サイズ、個体密度、飼育時間の影響を調べるため、採集後 1-3 時間以内に、サンプルから優占種のうち成体を選別した。選別した個体は、 $<0.2 \mu\text{m}$ ろ過海水で 2 回リンスし、無作為に 3 群に分けた。容器サイズによる影響を調べるため、3 群のうち 2 群をろ過海水を満たしておいて小さい飼育容器 (30 mL) および大きい飼育容器 (100 mL) にそれぞれ 1 個体ずつ収容した。このとき小型種 (*A. steueri*, *O. oculata*) の実験では、10 および 30 mL の飼育容器を用いた。以下、それぞれの実験区を SS (Single individual in a Small container) および SL (Single

individual in a Large container) と呼称することとする。加えて、個体密度による影響を調べるため、複数個体 (4–7 ind) を大きめの容器 (100 mL) に収容する実験区を設けた。以下、この実験区を ML (Multiple individuals in a Large container) と呼称する。これらの 3 つの実験区に加え、 $<0.2 \mu\text{m}$ ろ過海水のみ容器を用意し、コントロール区とした ($n = 3\text{--}5$)。各容器は採集地点における表面水温 (Table 3) で 4 時間、暗所で飼育を行い、終了後、各容器からアンモニアサンプルを分注した。分注後、長時間飼育による影響を調べるため、SL および ML 実験区の実験個体を $<0.2 \mu\text{m}$ ろ過海水を満たしておいた 100 mL 飼育容器に移し、続けて 20 時間飼育した。20 時間後、アンモニアサンプルを各容器から分注した。実験個体は実験を通して、生存していたことが確認された。ただし、ML 実験区での *E. californicus* のみ 1 個体の死亡が確認された。飼育後、実験個体は、体積および乾燥重量の後の測定のため、 -20°C で凍結保存した。

2.2.3. アンモニア濃度測定

飼育終了後、各サンプル中のアンモニア濃度は、高感度比色分析法を用いて分析した (Kodama et al., 2015a)。最小および最大検出限界はそれぞれ 7.2 および $1.0 \times 10^4 \text{ nM}$ であった。アンモニア排泄速度は各実験区のアンモニア濃度からコントロール区の平均アンモニア濃度を差し引いて計算した。長時間飼育におけるアンモニア排泄速度は、4 時間および 20 時間のインキュベーションにおけるアンモニア排泄の濃度を合計し、平均することで 24 時間の値として計算した。

2.2.4. 実験個体の体積および乾燥重量測定

陸上実験室では、持ち帰った実験個体の凍結試料を室温 (25°C) で解凍し、顕微鏡下で写真を撮影した。撮影した画像から Image J を用いて前体部および後体部の長さおよび幅を測定し (Schneider et al., 2012)、実験個体の形を回転楕円体と仮定し、体積を計算した。次いで、試料を 50°C で 24–48 時間乾燥させ、各試料の乾燥重量を電子天秤 (MSE6.6S, Sartorius Japan K.K., Tokyo, Japan) によって測定した。

2.2.5. 統計解析

割当水量および器壁との接触頻度という観点において、現場環境により近い条件と考えられる SL 実験区での値をベンチマークとして使用し、容器サイズ、個体密度、飼育時間が排泄速度に及ぼす影響を検証した。SL 実験区および他の実験区間での最初の 4 時間の排泄速度に

ついて、統計的差異を有意水準 $P=0.05$ でのスチューデント t 検定（両側検定）によって調べた。24 時間飼育における SL および ML 実験区での排泄速度の差についても上記と同様に t 検定を行った。SL および ML 実験区それぞれにおける 4 時間および 24 時間での排泄速度の比較は、対応のある t 検定（両側検定）または Wilcoxon 符号付順位和検定によって行った。このときも同様に $P < 0.05$ を有意水準とした。

2.3. 結果

2.3.1. 容器サイズの影響

小型容器を用いて単一個体飼育した実験区（SS）において、*C. sinicus*、*M. pacifica*、*P. abdominalis*、および *P. gracilis* の平均アンモニア排泄速度が、大きな容器によって単一個体飼育した実験区（SL）より有意に高くなった（ $P < 0.05$ 、Fig. 2a、c、e、f）。一方、*E. californicus* の排泄速度は、SS と SL 実験区間で有意な差はなかった（ $P > 0.05$ 、図 2b）。

2.3.2. 個体密度の影響

SL 実験区と大きな容器を用いて複数個体飼育した実験区（ML）において 4 時間飼育した結果を比較すると、*C. sinicus* および *P. abdominalis* の平均排泄速度は ML 実験区で SL 実験区（ $P < 0.05$ 、Fig 2a、d）より有意に高くなった。*E. californicus* および *M. pacifica* についても同様の傾向が見られたが、その差は有意ではなかった。

2.3.3. 飼育時間の影響

M. pacifica および *P. abdominalis* の SL および ML 実験区ならびに *C. sinicus* の ML 実験区において、時間の経過に伴って排泄速度の有意な減少が見られ、長時間飼育による影響が確認された（ $P < 0.05$ 、Fig. 3a、c、d）。一方で、*E. californicus* においては時間の経過に伴う有意な変化は見られなかった（ $P > 0.05$ 、図 3b）。

ほとんどの種において、長時間飼育を行った SL および ML 実験区間での有意差は見られなかった（ $P > 0.05$ 、図 2）。一方で、*E. californicus* においてのみ、ML 実験区での排泄速度が SL 実験区と比較して有意に高い値を示した（ $P < 0.05$ 、Fig 2）。

2.4. 考察

Sealed chamber 法は、動物プランクトンのアンモニア排泄速度測定法において最も一般的な方法である。その一方で、飼育時間および個体密度の 2 つの要因がトレードオフの関係にあ

り、どちらか一方の要因を優先して測定における好適条件にしても、もう一方が不適な条件となってしまう。本研究で用いた高感度分析法では、比較的大きな容器を用いて単一個体のアンモニア排泄速度を短時間で測定すること（SL 実験区）で、より好適な条件での測定が可能となった。そこで、ここでは SL 実験区における排泄速度を基準とし、容器サイズ、個体密度、長時間飼育による排泄速度への影響を検証することとする。

2.4.1. 容器サイズおよび個体密度の影響

4 時間飼育の結果において、小型容器（SS 実験区）によって飼育した *C. sinicus*、*M. pacifica*、*P. abdominalis*、および *P. gracilis* の単位乾燥重量あたりアンモニア排泄速度は、大型容器（SL 実験区）での値よりも有意に高くなった。これは、小型容器での飼育によって器壁との物理的相互作用、酸素の枯渇、および排泄の蓄積を引き起こす可能性が高まり、総じて実験的ストレスとして排泄速度に影響を及ぼすことによるものと考えられた（Ikeda et al., 2000）。しかしながら、これらの小型容器の影響による排泄速度の増加について、単純に容器が小さければ排泄速度が高まるという解釈ができない事例が報告されている。Kodama et al. (2015b) による実験において、13 および 100 mL の飼育容器にて 1 時間飼育した *C. sinicus* では、容器間でアンモニア排泄速度に有意な差は生じなかった。本研究と異なるこの現象の解釈として、過度に小さい容器（13mL）を用いたことによって *C. sinicus* の遊泳行動が制限され、排泄速度を高めるに至らなかったことが考えられる。同様に、本研究において最も体サイズの大きい *E. californicus* の結果についても、小さい容器（SS 実験区）において遊泳行動が制限され、排泄速度が高まらず、SL 実験区と有意差が生じなかったものと考えられる。これらの種の遊泳行動に与える容器サイズの影響についてさらに検証を加えることで、容器サイズによる代謝活性の低下について明らかにできるものとする。

また、複数個体実験区（ML）での 4 時間飼育において、*C. sinicus* および *P. abdominalis* の排泄速度が SL 実験区の結果と比較して有意に高い値を示した（Fig. 2a, d）。他種についても同様の傾向が見られたが、有意な変化ではなかった。従来の測定において、複数個体飼育による高密度飼育条件は一般的に用いられてきた一方で、個体間での不自然な物理的相互作用を増加させる可能性を常に伴ってきた（Ikeda et al., 2000）。Nival et al. (1974) は、カイアシ類 *Temora stylifera* を用いた実験において、250 mL 容器内で 200 個体（800 ind. L⁻¹）を飼育したときに、50 または 100 個体（200 または 400 ind. L⁻¹）を飼育した際と比較して、アンモニア排泄速度が 2 倍となったことを報告している。また、*Metridia gerlachei* を用いた実験において、高密度条件下（444 and 667 ind. L⁻¹）でのアンモニア排泄速度がより低密度条件下（222 ind.

L⁻¹) での値よりもおよそ 1.8 倍高くなる傾向にあったことが報告されている (Huntly and Nordhausen, 1995)。同様に本研究においても、同じ属の *M. pacifica* で 1.3 倍の排泄速度の増加が観察されている。

以上を踏まえて、小型容器および複数個体飼育による高密度条件浮遊性カイアシ類のアンモニア排泄速度を増加させ、一個体あたりの割当水量が実験条件下でのストレスを誘発する重要な要因のひとつであることが考えられた。そこで、容器サイズおよび個体密度による影響がそれぞれ同様の影響であるか否か検証するため、SS および ML 実験区それぞれにおける排泄速度について、SL 実験区を基準とした相対値を算出し、容器内の水量に対する実験個体の体積の比の変化に対してどのような値を取るか両実験区間で比較を行った (Fig. 4)。図より、排泄速度の相対値は、SS 実験区において ML 実験区よりも高い値を示すことが観察された。これより、本研究で用いたカイアシ類は、個体密度より容器サイズの変化による影響を強く受けると考えられた。

2.4.2. 飼育時間の影響

長時間飼育に対する各カイアシ類の排泄速度における応答は、種間で異なっていた。一般的に、無給餌下での長時間飼育は、動物プランクトン個体を飢餓状態に陥らせ、アンモニア排泄速度を低下させることが知られている (Ikeda and Skjoldal, 1980; Skjoldal et al., 1984)。本研究では、*M. pacifica* および *P. abdominalis* を用いた SL および ML の両実験区において、長時間飼育 (24 h) によって排泄速度の有意な低下が観察された。Huntley and Nordhausen (1995) による *Metridia gerlachei* を用いた実験においても 12 時間飼育した後に同様の低下傾向が見られている。また、Steinberg et al. (2002) による *P. xiphias* 実験においても、飼育開始から 4 から 8 時間目にかけてやや低下する傾向が見られている。これら先行研究における事例から、*Metridia* および *Pleuromamma* 属は一般的に、飼育時間の経過とともに排泄速度が低下しやすいと考えられた。両属は日周鉛直移動と同期して、摂餌における日周リズムを顕著に示すことが知られている (Arinardi et al., 1990; Batchelder, 1986)。採集により夜間の摂餌時間が限られていたことによる飢餓状態による影響に加えて、排泄速度も同様に日周リズムの影響を受けていると考えられる。これらの種は日周鉛直移動に伴って、表層から有光層以深へ無機態窒素およびリンの輸送を行う、いわゆる「アクティブフラックス」としての重要な役割を果たしていることでも知られている (Al-Mutairi and Landry, 2001; Hannides et al., 2009; Morales, 1999; Takahashi et al., 2008)。本研究結果を踏まえると、アクティブフラックスの見積もりの際には、排泄速度における日周変動を考慮する必要があると考えられた。

C. sinicus を用いた実験では、ML 実験区においてのみ 24 時間飼育による排泄速度の有意な低下が見られた。カラヌス目の飼育時間の経過に伴う排泄速度の低下はこれまでしばしば報告されており (Nival et al., 1974; Huntley and Nordhausen, 1995; Atkinson and Whitehouse, 2001)、これまで飢餓状態に陥ったことによるものと考えられてきた。しかしながら、本研究では SL 実験区において排泄速度の変動が見られなかったことを考慮すると、飢餓による影響はなかったと考えられる。Kodama et al. (2015b) による実験においても、給餌下および無給餌下で事前に飼育した *C. sinicus* の排泄速度は 24 時間の飼育では有意な変化が生じなかった一方で、飼育開始から 2 時間後、排泄速度に一時的な低下が観察されている。これらの結果は、*C. sinicus* が飢餓状態に比べ、自然環境と異なる実験条件に対してより敏感に影響を受けることを示唆している。したがって、ML 実験区における *C. sinicus* の排泄速度の低下は、高密度条件下に対する順応に伴うものであると考えられた。さらに、既報実験のほとんどが高密度条件下で行われていることを考慮すると、これまで報告されてきた時間の経過に伴う排泄速度の低下は、2 つの要因、すなわち飢餓状態および順化過程に起因する可能性が考えられた。

本研究で用いた種のうち *E. californicus* は、長時間飼育での排泄速度において、他種とは異なる応答を示した。それぞれの個体密度条件下において、飼育時間の経過に伴う有意な変化は見られなかった (Fig. 3b)。先行研究においても、*Eucalanus* 属の排泄速度について飼育時間の経過に伴う顕著な変化は見られなかった (Ikeda et al., 1982; Gardner and Paffenhöfer, 1982)。*E. pileatus* を用いた飼育実験において、アンモニア排泄速度の緩やかでわずかな低下が報告されており、この緩やかな代謝の変化は本種の代謝特性によるものであると解釈されている。その代謝特性とは、すなわち、変動の激しい餌環境に対する適応能力が低いことであり、餌濃度の低い環境下において、代謝活性を落とすなど環境に応じた調節を不得手とすると考えられている (Gardner and Paffenhöfer, 1982)。*E. californicus* も *E. pileatus* と同様に餌資源の豊かなカルフォルニア海流に生息しており (Bograd et al., 2010; Smith and Lane, 1991)、餌資源の乏しい環境下での代謝調節を不得手とすることが予想され、このことから 4 から 24 時間の飼育において変化が見られなかったと考えられた。その一方で、24 時間経過後に *E. californicus* の ML 実験区における排泄速度は、SL 実験区よりも有意に高くなっていた。ただ、個体密度の影響に関しては 4 時間目の排泄速度では有意でなかった。*E. californicus* において、飢餓状態に伴う排泄への影響が有意でなかったことを考慮すると (Fig. 3b)、本研究結果より、*E. californicus* は高個体密度条件下に対する順化が他種よりも不得手であることが考えられる。さらに、高密度条件下に対する順化も種によって異なると考えられ、今後の測定やこれまでのデータを扱う際に考慮する必要がある。

2.5. 結論

Sealed-chamber 法は、その実験設定の簡便さから、動物プランクトン排泄研究における標準的な方法として広く使われてきたが、その一方で、本手法は容器サイズや個体密度、飼育時間などの実験条件への制約が常に伴っていた。本研究では、これらの実験条件による影響は種によって異なり、浮遊性カイアシ類のアンモニア排泄速測定に有意な影響を持つことが示された。Sealed-chamber 法における実験条件への制約はアンモニア濃度測定法の検出感度が低かったために生じていた。そのため、本研究で示したように、高感度測定法の導入により、代謝活性測定における実験条件の改善につながると考えられる。

本研究で検証を行った各実験条件のうち、カイアシ類は高密度条件よりも容器サイズに敏感に反応していた (Fig. 5)。実験条件下における個体へのストレスを軽減するために、何よりもまず、容器サイズを個体の体サイズおよび測定法の検出限界に合わせて選択する必要がある。その一方で、本研究では 24 時間の長時間飼育による排泄速度の減少は、多くの種で共通して見られるということにはなかった。その一要因として、実験に用いたカイアシ類が比較的大きく、無給餌条件に対する耐性が高かったことが考えられた (Kodama et al., 2015b)。さらに、*C. sinicus* などの一部の種について、長時間の飼育において、順化過程によって容器サイズおよび個体密度の影響を打ち消すことが重要である可能性が考えられた。したがって、長時間飼育による排泄速度データを解釈する際には、飢餓状態による容器サイズおよび個体密度の条件による影響を加味する必要がある。特にこれらの条件は、飼育実験の初期に排泄速度の一時的な増加が生じると考えられる。

結論として、高感度分析法を導入することで、大きめの容器でかつ短時間での飼育が可能となり、浮遊性カイアシ類について実験的ストレスを減らし、現場でのアンモニア排泄速度データをより高い信頼性で得ることができる。また、単一個体での測定については、実験個体の選別にかかる時間や労力を削減できることから、測定条件として推奨される。特に、小型種などの飢餓耐性が低いと考えられる実験個体に対して重要な条件となるといえる。

第3章 黒潮周辺海域窒素循環に果たす日周鉛直移動性カイアシ類 *Pleuromamma* spp.の役割

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第4章 表層性カイアシ類による窒素再生への寄与

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第5章 亜熱帯海域窒素循環に果たす日周鉛直移動性動物プランクトンの役割

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第 6 章 窒素循環に果たすカイアシ類尿素排泄の役割

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第7章 総合考察

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

謝辞

本研究を進めるにあたって、懇切丁寧なご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻水圏生物環境学研究室の高橋一生准教授に心より感謝申し上げます。また、創価大学理工学部古谷研教授、東京大学大気海洋研究所国際連携分野の齊藤宏明教授ならびに同研究所浮遊生物分野西部裕一郎准教授、同研究所生元素分野の小川浩史准教授には、本研究遂行および本論文の執筆に当たり多大なご助言をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

また、東京大学アジア生物資源環境研究センターの岩滝光儀准教授には、本研究を遂行するにあたり多大な御助言と激励をいただきました。厚く御礼申し上げます。佐藤光秀助教にはセミナーをはじめ、日頃から様々な御助言、激励を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたって、日本海区水産研究所の児玉武稔研究員より、アンモニア排泄速度測定法をご教示いただき、折々に研究へのご助言、励ましを頂きました。加えて、アンモニア濃度に関するデータをご提供頂き、引用させていただきました。心より御礼申し上げます。また、東京大学大気海洋研究所浮遊性物分野の齊藤宏明准教授より、黒潮流軸域および太平洋亜熱帯海域（白鳳丸 KH-17-4 次航海）におけるセジメントトラップデータを提供いただき、引用させていただきました。ここに厚く御礼申し上げます。また、水圏生物環境学研究室の堀井幸子氏、山口珠葉氏、同研究室卒業生の滝野翔大氏より、太平洋亜熱帯海域（白鳳丸 KH-17-4 次航海）での基礎生産速度データをご提供いただき、引用させていただきました。厚く御礼申し上げます。

中央水産研究所の小埜恒夫研究員、清水勇吾研究員、日高清隆研究員、平井惇也研究員、廣江豊研究員、森田宏補助調査員より、調査船「蒼鷹丸」への乗船にあたって、格別のご配慮を賜りました。また、動物プランクトン現存量データ、各種環境要因データをご提供いただきました。心より深く感謝申し上げます。

調査船「蒼鷹丸」の船長をはじめ乗組員の皆様には心から御礼申し上げます。また、各研究航海において採水やルーチン分析にご協力頂きました中央水産研究所研究員、事務職員および学生の皆様に、心から感謝申し上げます。

最後に、東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物環境学研究室の研究員、学生の皆様には多大な御協力と励ましを頂きました。心より御礼申し上げます。

引用文献

- Al-Mutairi H, Landry MR (2001) Active export of carbon and nitrogen at Station ALOHA by diel migrant zooplankton. *Deep-Sea Res II* 48: 2083–2103.
- Arinardi OH, Baars MA, Oosterhuis SS (1990) Grazing in tropical copepods, measured by gut fluorescence, in relation to seasonal upwelling in the Banda Sea (Indonesia). *Netherlands J Sea Res* 25: 545–560.
- Atkinson A, Whitehouse MJ (2001) Ammonium regeneration by Antarctic mesozooplankton: An allometric approach. *Mar Biol* 139: 301–311.
- Batchelder H (1986) Phytoplankton balance in the oceanic subarctic Pacific: grazing impact of *Metridia pacifica*. *Mar Ecol Prog Ser* 34: 213–225.
- Bograd SJ, Sydeman WJ, Barlow J, Booth A, Brodeur RD, Calambokidis J, Chavez F, Crawford WR, Di Lorenzo E, Durazo R, Emmett R, Field J, Gaxiola-Castro G, Gilly W, Goericke R, Hildebrand J, Irvine JE, Kahru M, Koslow JA, Lavaniegos B, Lowry M, Mackas DL, Manzano-Sarabia M, McKinnell SM, Mitchell BG, Munger L, Perry RI, Peterson WT, Ralston S, Schweigert J, Suntsov A, Tanasichuk R, Thomas AC, Whitney F (2010) Status and trends of the California Current region, 2003–2008. In: *Marine Ecosystems of the North Pacific Ocean, 2003–2008* (eds McKinnell SM, Dagg MJ). PICES Special Publication 4, pp. 106–141.
- Båmstedt U (1985) Seasonal excretion rates of macrozooplankton from the Swedish west coast. *Limnol Oceanogr* 30: 607–617.
- Båmstedt U, Tande KS (1985) Respiration and excretion rates of *Calanus glacialis* in arctic waters of the Barents Sea. *Mar Biol* 87: 259–266.
- Gardner WS, Paffenhöfer GA (1982) Nitrogen regeneration by the subtropical marine copepod *Eucalanus pileatus*. *J Plankton Res* 4: 725–734.

- Gaudy R, Boucher J (1983) Relation between respiration, excretion (ammonia and inorganic phosphorus) and activity of amylase and trypsin in different species of pelagic copepods from an Indian Ocean equatorial area. *Mar Biol* 75: 37–45.
- Gómez-Gutiérrez J, Peterson WT (1999) Egg production rates of eight calanoid copepod species during summer 1997 off Newport, Oregon, USA. *J Plankton Res* 21: 637–657.
- Hannides CCS, Landry MR, Benitez-Nelson CR, Styles RM, Montoya JP, Karl DM (2009) Export stoichiometry and migrant-mediated flux of phosphorus in the North Pacific Subtropical Gyre. *Deep-Sea Res I* 56: 73–88.
- Harris RP, Malej A. (1986) Diel patterns of ammonium excretion and grazing rhythms in *Calanus helgolandicus* in surface stratified waters. *Mar Ecol Prog Ser*: 75–85.
- Hashihama F, Kanda J, Tauchi A, Kodama T, Saito H, Furuya K (2015) Liquid waveguide spectrophotometric measurement of nanomolar ammonium in seawater based on the indophenol reaction with o-phenylphenol (OPP). *Talanta* 143: 374–380.
- Hernández-León S, Fraga C, Ikeda T (2008) A global estimation of mesozooplankton ammonium excretion in the open ocean. *J Plankton Res* 30: 577–585.
- Hernández-León S, Torres S, Gómez M, Montero I, Almeida C (1999) Biomass and metabolism of zooplankton in the Bransfield Strait (Antarctic Peninsula) during austral spring. *Polar Biol* 21: 214–219.
- Huntley ME, Nordhausen W (1995) Ammonium cycling by Antarctic zooplankton in winter. *Mar Biol* 121: 457–467.
- Ikeda T (1974) Nutritional ecology of marine zooplankton. *Memories Fac Fish Hokkaido Univ* 22: 1–97.
- Ikeda T, Hing Fay E, Hutchinson S, Boto G (1982) Ammonia and Inorganic phosphate excretion by zooplankton from inshore waters of the Great Barrier Reef, Queensland. I. Relationship between excretion rates and body size. *Aust J Mar Freshw Res* 33: 55–70.

- Ikeda T, Kanno Y, Ozaki K, Shinada A (2001) Metabolic rates of epipelagic marine copepods as a function of body mass and temperature. *Mar Biol* 139: 587–596.
- Ikeda T, Mitchell AW (1982) Oxygen uptake, ammonia excretion and phosphate excretion by krill and other Antarctic zooplankton in relation to their body size and chemical composition. *Mar Biol* 71: 283–298.
- Ikeda T, Skjoldal HR (1980) The effect of laboratory conditions on the extrapolation of experimental measurements to the ecology of marine zooplankton VI. Changes in physiological activities and biochemical components of *Acetes sibogae australis* and *Acartia australis* after capture. *Mar Biol* 58: 285–293.
- Ikeda T, Skjoldal HR (1989) Metabolism and elemental composition of zooplankton from the Barents Sea during early Arctic summer. *Mar Biol* 100: 173–183.
- Ikeda T, Torres JJ, Hernández-León S, Geiger SP (2000) Metabolism. In: ICES Zooplankton Methodology Manual (eds Harris R, Wiebe P, Lenz J, Skjoldal HR, Huntley M). Academic Press, San Diego, pp. 455–532.
- Jawed M (1973) Ammonia excretion by zooplankton and its significance to primary productivity during summer. *Mar Biol* 23: 115–120.
- Kiko R, Hauss H, Buchholz F, Melzner F (2015) Ammonium excretion and oxygen respiration of tropical copepods and euphausiids exposed to oxygen minimum zone conditions. *Biogeosciences Discuss* 12: 17329–17366.
- Kodama T, Ichikawa T, Hidaka K, Furuya K (2015a) A highly sensitive and large concentration range colorimetric continuous flow analysis for ammonium concentration. *J Oceanogr* 71: 65–75.
- Kodama T, Takahashi K, Nakamura K, Shimode S, Yamaguchi T, Ichikawa T (2015b) Short-term variation in the *Calanus sinicus* ammonium excretion rate during the post-capture period. *Plankt Benthos Res* 10: 75–79.

- Le Borgne R (1986) The release of soluble end products of metabolism. In: The Biological Chemistry of Marine Copepods (eds Corner EDS and O'Hara SCM). Clarendon Press, New York, pp. 109–164.
- Ma Z, Li W, Gao K (2013) Impacts of UV radiation on respiration, ammonia excretion, and survival of copepods with different feeding habits. *Hydrobiologia* 701: 209–218.
- Mayzaud P (1973) Respiration and nitrogen excretion of zooplankton. II. Studies of the metabolic characteristics of starved animals. *Mar Biol* 21: 19–28.
- Miller CA, Landry MR (1984) Ingestion-independent rates of ammonium excretion by the copepod *Calanus pacificus*. *Mar Biol* 78: 265–270.
- Miller CA, Roman MR (2008) Effects of food nitrogen content and concentration on the forms of nitrogen excreted by the calanoid copepod, *Acartia tonsa*. *J Exp Mar Bio Ecol* 359: 11–17.
- Morales C (1999) Carbon and nitrogen fluxes in the oceans: the contribution by zooplankton migrants to active transport in the North Atlantic during the Joint Global Ocean Flux Study. *J Plankton Res* 21: 1799–1808.
- Nival P, Malara G, Charra R, Palazzoli I, Nival S (1974) Étude de la respiration et de l'excrétion de quelques copépodes planctoniques (crustacea) dans la zone de remontée d'eau profonde des côtes marocaines. *J Exp Mar Bio Ecol* 15: 231–260.
- Paffenhöfer GA, Gardner WS (1984) Ammonium release by juveniles and adult females of the subtropical marine copepod *Eucalanus pileatus*. *J Plankton Res* 6: 505–513.
- Saba GK, Steinberg DK, and Bronk DA (2009) Effects of diet on release of dissolved organic and inorganic nutrients by the copepod *Acartia tonsa*. *Mar Ecol Prog Ser* 386: 147–161.
- Saba GK, Steinberg DK, Bronk DA (2011) The relative importance of sloppy feeding, excretion, and fecal pellet leaching in the release of dissolved carbon and nitrogen by *Acartia tonsa* copepods. *J Exp Mar Bio Ecol* 404: 47–56.

- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675.
- Skjoldal HR, Båmstedt U, Klinken J, Laing A (1984) Changes with time after capture in the metabolic activity of the carnivorous copepod *Euchaeta norvegica* Boeck. *J Exp Mar Bio Ecol* 83: 195–210.
- Smith SL (1978) Nutrient regeneration by zooplankton during a red tide off Peru, with notes on biomass and species composition of zooplankton. *Mar. Biol.* 49, 125–132.
- Smith SL, Lane PVZ (1991) The jet off Point Arena, California: Its role in aspects of secondary production in the copepod *Eucalanus californicus* Johnson. *J Geophys Res* 96: 14849–14858.
- Steinberg DK, Goldthwait SA, Hansell DA (2002) Zooplankton vertical migration and the active transport of dissolved organic and inorganic nitrogen in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Res* 49: 1445–1461.
- Takahashi K, Kuwata A, Sugisaki H, Uchikawa K, Saito H (2009) Downward carbon transport by diel vertical migration of the copepods *Metridia pacifica* and *Metridia okhotensis* in the Oyashio region of the western subarctic Pacific Ocean. *Deep-Sea Res I* 56: 1777–1791.
- Whitehouse MJ (1997) Automated seawater nutrient chemistry. British Antarctic Survey, Cambridge.
- Zeiss FR (1963) Effects of population densities on zooplankton respiration rates. *Limnol Oceanogr* 8: 110–115.