

博士論文

西部北太平洋亜寒帯域における *Neocalanus* 属カイアシ類 3 種の生活史に関する研究

藤岡 秀文

The University of Tokyo

2016

目次

第1章 緒言	1
北太平洋に分布する <i>Neocalanus</i> 属カイアシ類.....	1
高緯度域におけるカイアシ類の生活史.....	2
Capital breeding 型カイアシ類生活史の未解明点.....	12
ノープリウス幼生.....	14
体色変化.....	17
本研究の目的.....	21
第2章 Real-time PCR を用いた <i>Neocalanus</i> 属カイアシ類ノープリウス幼生	
の種同定方法について	23
緒言.....	23
材料と方法.....	28
結果.....	36
<i>Neocalanus</i> 属 3 種特異的なプローブとプライマー、判別式の作成.....	36
種同定の結果と精度検証.....	42
考察.....	52
第3章 <i>Neocalanus</i> 属カイアシ類の初期生活史	53
緒言.....	53
材料と方法.....	57
結果.....	59
環境データ.....	59

カラヌス目ノープリウス幼生の季節変化.....	60
<i>Neocalanus</i> 属 3 種の雌成体とノープリウス幼生の季節変化と鉛直分布.....	60
考察.....	73
<i>Neocalanus cristatus</i> の初期生活史.....	73
<i>Neocalanus flemingeri</i> の初期生活史.....	75
<i>Neocalanus plumchrus</i> の初期生活史.....	79
第 4 章 <i>Neocalanus</i> 属カイアシ類における体色変化について.....	83
諸言.....	83
材料と方法.....	85
結果.....	87
分布深度の変化に伴う赤色面積率変化.....	87
脂質含有面積と赤色面積率の関係.....	89
考察.....	90
第 5 章 総合考察.....	95
<i>Neocalanus cristatus</i> 生活史の特徴.....	95
<i>Neocalanus flemingeri</i> 生活史の特徴.....	96
<i>Neocalanus plumchrus</i> 生活史の特徴.....	97
謝辞.....	106
引用文献.....	108

第1章 緒言

1.1. 北太平洋に分布する *Neocalanus* 属カイアシ類

北太平洋亜寒帯域には、3種のカラヌス目 *Neocalanus* 属カイアシ類、*Neocalanus cristatus*、*N. flemingeri*、*N. plumchrus* が生息しており、同所的に分布するカラヌス目カイアシ類 *Eucalanus bungii* と共に春季から夏季の表層に分布する動物プランクトン生物量の約 80~90%を占める、当海域の優占種である (Vinogradov 1968)。3種の *Neocalanus* 属カイアシ類は、北太平洋の高緯度域において、日本沿岸の親潮域から、ジョージア海峡まで東西に広い高緯度海域の外洋域に分布している (Vinogradov 1968; Miller and Clemons 1988; Mackas and Tsuda 1999)。出現域の北限は北極海にあり、北緯の 72°西部北極海においても *N. flemingeri* の採集報告が存在する (Matsuno et al. 2012)。南限は北緯の 35°日本沿岸の相模湾から *N. cristatus* が採集されている (Shimode et al. 2006)。しかし、北緯 30°~25°における *Neocalanus* の採集報告は存在せず (Yamaguchi et al. 2004)、また、相模湾では初期の成長段階が出現しないため、相模湾の個体群は親潮域からの移流によるものだと考えられている (Oh et al. 1991; Shimode et al. 2006)。

Neocalanus 属カイアシ類は雑食性であり、主に珪藻類などの植物プランクトンや、渦鞭毛虫類、繊毛虫類などの微小動物プランクトンを摂餌している (Kobari et al. 2003、2010)。また、上記の動植物プランクトンに加えて、沈降粒子を摂食している可能性も示唆されており (Booth et al. 1993; Dagg 1993)、さらに、捕食対象を餌環境に応じて変化させることが可能だとも考えられている (Dagg 1993; Gifford 1993; Takahashi et al. 2008)。*Neocalanus* 属 3種が生息域の微小動植物プランクトン群集に与える影響は大きく、Kobari et al. (2003)は、親潮域では *Neocalanus* 属が植物プランクトンの年間一次生産量の約 26.6% ($38.9 \text{ gC m}^{-2} \text{ year}^{-1}$)を消費すると推定している。また、*Neocalanus* 属の摂餌が微小動物プランクトンの個体数密度に大きな影響をあたえることが示唆されている (Gifford 1993)、さ

らに、大型の珪藻類に加えて小型珪藻類の捕食者である微小動物プランクトンを選択的に摂餌するため、小型珪藻類の増殖を促進させ、間接的に海域の植物プランクトン群集のサイズ組成を変化させると考えられている (Shimode and Asami 1999; Liu et al. 2005; Dagg et al. 2006)。北太平洋の魚類 (Grover and Olla 1987; Moku et al. 2000; Yamamura et al. 2002)や鯨類 (Kawamura 1982)などの高次捕食者にとって *Neocalanus* 属は重要な餌生物であり、鳥類には選択的に *Neocalanus* 属カイアシ類を摂餌する Cassin's Auklet が報告されている (Bertram et al. 2001; Hipfner 2008)。また、成長に伴う鉛直移動 (OVM; Ontogenetic vertical migration)を行うため (Miller et al. 1984, Miller and Clemons 1988, Tsuda et al. 1999, 2004, Kobari and Ikeda 2001a, b, Kobari et al. 2004)、中深層に分布する十脚類や、ゼラチン質プランクトンの主要な餌資源だと考えられている (Nishida et al. 1988; Nishikawa et al. 2001)。*Neocalanus* 属は有機炭素の鉛直的な輸送者として重要な動物プランクトンであり、水深 1000 m における沈降粒子では、*Neocalanus* 属の糞粒が約 14.9% ($0.7 \text{ gC m}^{-2} \text{ year}^{-1}$)の有機炭素を占める (Kobari et al. 2003)。また、OVM を行うことで有機炭素の約 $1.9\sim 4.3 \text{ gCm}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ を表層から深層に輸送する (Kobari et al. 2003, 2008; Harrison et al. 2004)。

1.2. 高緯度域におけるカイアシ類の生活史

緯度域には *Neocalanus* 属 3 種の他に、*Eucalanus* 属やカラヌス目 *Calanus* 属カイアシ類などの中・大型カイアシ類が多く分布している (Conover 1988)。高緯度域における海洋環境は、季節的な環境変化が大きく、植物プランクトンが増殖できる期間が短期間のみ限定される。上記 3 属のカイアシ類を含めた一次・二次消費者の多くは、短期間のみ増殖する餌生物を有効に利用する生活史、生存戦略を持ち、種ごとに程度の違いはあるが、固有の生活史パターンに沿って同期的に移動、成長している (Conover 1988)。また、同所的に分布する近縁種間でも生活史に差異が存在し、それぞれが異なる生存戦略を持っている

と考えられている。動物プランクトンの生活史と生存戦略を研究することによって、研究対象種の時空間的な分布と、現存量に影響を与える要因の解明が可能である。特に研究海域に優占する動物プランクトンの場合、生活史の詳細は、海域の生態系における物質循環や、食物網動態を理解する上で非常に重要だと考えられる。

カイアシ類の生活史、生存戦略の共通の特徴として、寄生性などの特殊な生態を持つ種を除き、孵化から計 11 回脱皮し成体へと成長する点が挙げられる。5 回目の脱皮までをノープリウス幼生期と呼び、脱皮回数に応じてノープリウス幼生 1~6 期 (N1~6) と呼ぶ。ノープリウス幼生は 6 回目の脱皮後、コペポダイト期 1 期 (C1) となり、5 回の脱皮後に、成体 (C6) へと成長する。ノープリウス幼生期とコペポダイト期は形態的に異なり、遊泳能力、捕食者からの逃避能力、摂餌能力が大きく異なる (Fernández 1979; Turner 2004; Gemmell and Buskey 2011; Bradley et al. 2013)。そのため、季節的な環境変化が顕著な高緯度域では、成長段階ごとに好適な生息環境に移動することが生存戦略上で重要である。しかし、魚類などのネクトンとは異なり、カイアシ類は遊泳能力が低く、大規模な水平移動が不可能である。カイアシ類は、鉛直的な移動や成長を停滞させ、成長段階の滞留時間を調節することで、好適な生息環境を時空間的に利用している。

鉛直移動には上述の OVM と昼夜で分布深度を変える日周鉛直移動 (DVM; Diel vertical migration) があり、カイアシ類に限らず多くの動物プランクトンが行う行動の一つである (Conover 1988)。 *Neocalanus* 属を含めた高緯度域に分布する外洋性カイアシ類の一部は成長に伴う季節的な鉛直移動 (OVM) を行い、豊富な餌が存在する期間に表層に移動し、それ以外の期間は主に 200 m 以深の深層に分布する (Conover 1988; Hirche 1983; Hirche 1998; Shoden et al. 2005 etc.)。OVM および DVM には、深層へ移動することによる、視覚捕食者からの逃避や (Lampert 1993; Hay et al. 1994, 2003)、水温低下に伴う代謝の低下による消費エネルギーの節約などの働きがあると考えられている (McLaren 1963; Enright 1977)。

カイアシ類の成長停滞機構は、悪条件（低水温、貧栄養）を経験し、条件が好転するまで成長を停滞させる休止（quiescence）と、生理的な変化を伴い、一定期間経過しない限り成長を再開する休眠（diapause）の 2 つに大別される（Dahms 1995）。*Neocalanus* 属や *Calanus* 属は、主にコペポダイト期に、表層から深層に移動した後に成長を停滞させることが報告されている（Conover 1988）。成長停滞期間中、呼吸速度の低下（Hirche 1983）、RNA/DNA 比の低下（Kobari et al. 2013）、タンパク質合成酵素 aminoacyl-tRNA synthetases 活性の低下（Yebra et al. 2006）などの生理的な変化が報告されており、*Neocalanus* 属や *Calanus* 属の成長停滞機構は休眠であると考えられる。休眠期間中の個体は、非休眠中の個体とは異なる特徴を持ち、ワックスエステルなどの脂質蓄積に伴う油球形成（Ikeda et al. 2004; Lee et al. 2006）、消化管内容物の消失（Hallberg and Hirche 1980）、摂餌物をかみ砕く下顎の顎基退化（Miller and Grigg 1991）などが報告されている。*Neocalanus* 属や *Calanus* 属では、生息域の異なる同種内で休眠期間の差異が報告されている（e.g. Conover 1988; Tsuda et al. 1999, 2015; Mackas et al. 2012; Head et al. 2013）。また、*Calanus* 属では休眠する個体群と、成長と再生産を続ける個体群が同所的に混在する場合もあり（Ohman et al. 1998）、生理的な差異が休眠開始に影響すると考えられる。

カイアシ類の産卵様式は大きく分けて income breeding 型と capital breeding 型が存在する（Varp et al. 2009; Sainmont et al. 2014）。産卵直前に摂餌し、摂餌した栄養を主として用いて産卵を行う産卵様式を income breeding 型産卵様式と呼び、産卵を体内に蓄えた栄養を主として用いる産卵様式を capital breeding 型産卵様式と呼ぶ（Stearns 1992）。親潮域に分布する中・大型カイアシ類では、*Calanus* 属カイアシ類や、*Eucalanus* 属カイアシ類らが、摂餌のために深層から表層に移動し、産卵を行うことが報告されている（Marshall and Orr 1955; Shoden et al. 2005; Takahashi and Ide 2011）。しかし、*Calanus* 属や *Eucalanus* 属カイアシ類は脂質を蓄積し、休眠することに加えて、*Calanus* 属カイアシ類の一種 *C. glacialis* は、蓄えた脂質の一部を産卵に使用するため（Falk-Petersen et al.

2009; Daase et al. 2013; Pasternak et al. 2013)、典型的な income breeding 型というよりは income breeding 型と capital breeding 型の間中型と言える。本稿では表層で産卵し、かつ産卵に摂餌を伴う種を income breeding 型として扱う。Capital breeding 型産卵様式を持つカイアシ類は、*Neocalanus tonsus* を除く *Neocalanus* 属カイアシ類が該当する (Heinrich 1962; Fulton 1973; Miller et al. 1984; Ohman 1987; Miller and Clemons 1988; Saito and Tsuda 2000; Shimode et al. 2009)。また、*Calanus* 属では例外的に *Calanus hyperboreus* が Capital breeding 型の産卵様式を持つと考えられる (Hirche 1997; Falk-Petersen et al. 2009)。

1.2.1. Income breeding 型、*Calanus* 属の生活史パターンと特徴

Income breeding 型カイアシ類の成体は、深層から表層に移動した後、摂餌し産卵を行う。孵化したノープリウス幼生は表層でコペポダイト期まで成長した後、脂質を蓄積し、再び深層へと移動する。深層に移動した個体は、休眠後に成体へと成長する (Conover 1988)。Income breeding 型のカイアシ類の産卵には、豊富な餌環境が必要であり、季節的な植物プランクトン高生産期に伴い産卵が行われる場合が多い。そのため、income breeding 型カイアシ類における生活史の季節性は、植物プランクトン高生産期発達のタイミングや規模に大きな影響を受け変動する。また、種によって産卵のタイミングが異なり、北極域に同所的に分布する *Calanus glacialis* と *Calanus finmarchicus* の生活史を比較した研究では、*C. glacialis* は春季植物プランクトン高生産期前に産卵を開始し、*C. finmarchicus* は高生産期と同期的に産卵を開始することが報告されている (Falk-Petersen et al. 2009)。Madsen et al. (2001)によると、グリーンランド西部の Disko 湾における研究においても、2種の産卵期には同様の特徴が認められている。*Calanus glacialis* は他の income breeding 型の *Calanus* 属と同じ生活史 (OVM、休眠、表層産卵)を持つが、産卵直前に摂食する必要が無く、蓄積した脂質を使用して産卵が可能である (Falk-Petersen et al. 2009; Daase et al.

2013; Pasternak et al. 2013)。そのため、*C. finmarchicus* とは異なり、*C. glacialis* は植物プランクトン高生産期に先駆け産卵を開始することができると考えられている。また、income breeder 型のカイアシ類は、種によって産卵に必要な餌料の量が異なる可能性が示唆されており、近縁種間で産卵期が異なる要因の一つと考えられている。Osgood and Frost (1994)は、アメリカ西海岸、Babob 湾に同所的に分布する *Calanus pacificus* の産卵期が *Calanus marshallae* に比べ明瞭に遅いと指摘し、*C. marshallae* は春季植物プランクトン高生産期発生直後の植物プランクトンを利用して産卵をするのに対して、*C. pacificus* は *C. marshallae* に比べ餌料の必要量が高く、高生産期中に増殖する植物プランクトンを利用する必要があり、産卵期が遅れると示唆されている。生活史季節性の変化は年変化することが報告されており、カナダの Beaufort 海では、*C. glacialis* の産卵期は、春季植物プランクトン高生産期が早期に起こる場合、それに伴い産卵開始が早くなる (Daase et al. 2013)。北極海においても、同様の報告が存在し、海氷が早期に消失し植物プランクトン高生産期が早期に発達する年は、それ以外の年に比べ *C. glacialis* の C1 が早期に出現する (Ringuette et al. 2002)。また、大西洋における *C. finmarchicus* においても、植物プランクトン高生産期発達のタイミング変化に伴い、産卵期が変化すると示唆されている (Head et al. 2013)。さらに、income breeding 型 *Calanus* 属では、同種であっても、植物プランクトン高生産期の規模や発達のタイミングなどの環境要因の差異によって、世代時間が大きく変化すると報告されており、大西洋における *C. finmarchicus* は、年間 1 世代と一般的に考えられているが (Conover 1988)、ノルウェー海では年間 2 世代型の生活史を持つ個体群が存在する (Broms and Melle 2007)。

1.2.2. Capital breeding 型、*Neocalanus* 属の生活史パターンと特徴

Income breeding 型生活史の研究は、capital breeding 型に先駆けて Marshall and Orr (1955)によって行われ、*C. finmarchicus* の産卵数は産卵期間中の餌環境によって変化する

と報告されている。これに対して *Neocalanus plumchrus* 雌成体の下顎は顎基が退化することから (Campbell 1934)、産卵期における摂餌行動が不可能であり、*N. plumchrus* は *C. finmarchicus* などとは異なる capital breeding 型の生活史を持つと考えられた (Heinrich 1962)。その後、Fulton (1973)によって *N. plumchrus* の生活史パターンが報告された。*Neocalanus plumchrus* 雌成体は、income breeding 型とは異なり表層に移動せず深層で産卵を行う。孵化したノープリウス幼生は表層へ移動し、コペポダイト期へ成長する。その後、表層にて後期のコペポダイト期まで成長し、脂質を蓄積した後に再び深層へと移動し休眠する。北太平洋に分布する *Neocalanus* 属 3 種は一部を除き、年間 1 世代であり、主な産卵は植物プランクトン高生産期に先駆けて行われ、類似した生活史パターンを持つと報告されていた。しかし、近年に行われた研究の結果、3 種の生活史には差異があり、異なる生存戦略をもち、北太平洋に同所的に生息していることが明らかになっている (Miller et al. 1984; Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999, 2004; Kobari and Ikeda 1999, 2001a,b; etc)。下記に、3 種の生活史を述べる。

Neocalanus cristatus は 500 m 以深にて、主に 10~12 月に産卵を行う (Miller et al. 1984; Kobari and Ikeda 1999; Tsuda et al. 2004)。初期コペポダイト期は通年出現し、10~12 月に同期的に産卵を行っている個体群の他に、非同期的に産卵を行う個体群の存在が報告されており、この長い再生産期間は他の 2 種には認められない、本種の特徴と言える (Miller et al. 1984; Kobari and Ikeda 1999; Tsuda et al. 2004)。初期コペポダイト期の現存量は 1~2 月に最大値に達する。コペポダイト期の分布層は C1~5 まで 250 m 以浅に分布するが、C1 のみ出現深度は深く、250 m 以深からの出現報告がある (Kobari and Ikeda 1999)。油球はコペポダイト期を通して体内に確認でき、C5 の油球が最も大きいため、主な脂質蓄積期間は C5 だと考えられる (Kobari and Ikeda 1999; Tsuda et al. 2001)。C5 は 7~8 月に深層に移動するため、250 m 以浅に C1~5 が分布する期間は 1~7 月の約 6 カ月であり、3 種の *Neocalanus* 属の中では最も長期間である。また、Mackas et al. (1993)や Tsuda

et al. (2014)は、夏季のコペポダイト期における *Neocalanus* 属 3 種は、鉛直的な棲み分けを行っている」と報告しており、*N. cristatus* は他の 2 種の下層に分布している。分布深度の違いは、3 種の食性の違いを反映していると考えられ、表層で卓越する植物プランクトンや繊毛虫類を *N. plumchrus* と *N. flemingeri* が摂餌するのに対して、*N. cristatus* は亜表層で沈降粒子を主に摂餌すると示唆されている (Booth et al. 1993; Dagg 1993)。深層に移動した同期個体群の C5 は休眠し、10 月以前に脱休眠し C6 へと成長する。

Neocalanus flemingeri の産卵個体は 10 月から翌年の 3 月まで出現し、主要な産卵期は 1~2 月だと考えられている (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2001a)。産卵は 250 m 以深で行われ、初期のコペポダイト期は産卵深度以浅から 10 月から翌年の 3 月に出現し、2~3 月に現存量が最大値に達する。コペポダイト期は、C5 に成長する 5 月まで表層に分布する。*Neocalanus flemingeri* は C2 から明瞭な油球を体内に持つため、他の 2 種に比べ脂質の蓄積開始が早いと考えられている (Kobari and Ikeda 1999; Tsuda et al. 2001)。また、*N. flemingeri* には他の *Neocalanus* 属にはない、生活史の違いが存在し、他の 2 種が C5 で休眠するのに対して、深層に移動した *N. flemingeri* の C5 は C6 に脱皮し交尾を終えた後に、雌成体のみが休眠を行う (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2001a)。

Neocalanus plumchrus は北太平洋亜寒帯域において他の 2 種に比べ現存量が高いと報告されている (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999, 2015; Kobari and Ikeda 1999, 2001a, b)。産卵個体は 10 月から翌年の 5 月まで一定の割合で出現するため、主要な産卵期は約 6 カ月間と考えられ、北太平洋亜寒帯域の *Neocalanus* 属内では最長である (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2000a, b)。初期コペポダイト期は秋季から翌年の冬季には出現せず、3 種内では最も遅い 5 月に、表層から出現する。2~3 カ月間表層で摂餌を行い C5 へ成長した後、8 月に深層へと移動する。

Neocalanus plumchrus に比べ、*N. flemingeri* は早期から脂質蓄積を開始するため、突

然の餌環境変化を受けても生存することが可能であり、餌環境が安定しない早春の海洋環境に適応していると考えられている (Tsuda et al. 2001)。一方、*N. plumchrus* は、安定した餌環境が存在する春季から早夏に表層に分布するため、早期に脂質蓄積を開始する必要がなく迅速な成長が可能だと示唆されている (Tsuda et al. 2001)。

Income breeding 型の *Calanus* 属と同様に、*Neocalanus* 属も同種内で生活史の差異が報告されている。上記の通り、*Neocalanus* 属 3 種は、一般的に 1 年 1 世代であるが、*N. flemingeri* では 2 年 1 世代の生活史を持ち、C4 でも休眠する個体群が日本海、親潮域、オホーツク海から出現している (Miller and Terazaki 1989; Tsuda et al. 1999, 2001; Machida and Tsuda 2010; Tsuda et al. 2015)。親潮域およびオホーツク海に分布する年間 1 世代型個体群における雌成体の前体部長は約 3.8~4.2 mm なのに対して、2 年 1 世代個体群の多くは、1 年性と比べ全体部長が大きく約 4.5~4.8 mm になるため (Tsuda et al. 2001)、1 世代型が *N. flemingeri* small form (*N. flemingeri* S)、2 年型が large form (*N. flemingeri* L) と呼ばれている。Machida and Tsuda (2010) により、small form と large form の集団遺伝学的な比較が行われ、ミトコンドリア DNA の COI と 12s 領域において、両個体群を判別できる塩基配列の変異が存在することが判明した。親潮域とは異なり、オホーツク海に分布する *N. flemingeri* は、small form に比べ large form 個体群の割合が高く、large form は主にオホーツク海に分布する個体群だと考えられている (Tsuda et al. 1999, 2015)。オホーツク海における *N. flemingeri* L は、初期のコペポダイト期が 4~7 月に出現し、small form に比べて表層出現が 1 カ月遅い (Tsuda et al. 2015)。この結果から、*N. flemingeri* L の産卵期間と鉛直移動のタイミングは small form に比べて遅いと考えられる (Tsuda et al. 1999, 2015)。オホーツク海と親潮域は海洋環境が大きく異なり、オホーツク海では、主に 11 月から翌年の 6 月まで海氷が存在し、植物プランクトン生産に大きな影響を与えている (Parkinson and Gratz 1983)。オホーツク海の *N. cristatus* と *N. plumchrus* の生活史も、親潮域の生活史とは異なり、初期コペポダイト期の出現期間が 1~2 カ月遅く、また長期に

渡り表層に分布すると報告されている (Tsuda et al. 2015)。さらに、オホーツク海における *N. plumchrus* の産卵期は、親潮域と比べ1カ月長く続くと考えられ (Tsuda et al. 2015)、*N. cristatus* は通年産卵を続ける個体群の割合が高い可能性があり、季節的な成長段階の推移が親潮域に比べ不明瞭だと報告されている (Tsuda et al. 2015)。北米西海岸沖の陸棚域を含むアラスカ循環域では、生息域によって *N. plumchrus* 生活史の季節性に1~2カ月の差異が認められており、外洋域の観測点 (Stn. P [50°N 145°W]) に比べ、ジョージア海峡やバンクーバー島沿岸に分布する *N. plumchrus* 個体群は、産卵期や初期コペポダイト期が表層から出現するタイミングが早いと報告されている (Fulton 1973; Mackas et al. 1998; Batten and Mackas 2009; Mackas et al. 2012)。また、C5 が年間最大生物量を維持する期間が Stn. P では約60日以内なのに対して (Miller et al. 1984; Miller et al. 1993)、ジョージア海峡やベーリング海の陸棚域では約40日以内と報告されており (Fulton 1973; Vidal and Smith 1986)、沿岸域に分布する個体群ほど外洋域に比べて同期的に成長しているか、成長速度が速い可能性が示唆されている (Mackas et al. 1998)。北太平洋亜寒帯域では海域による海洋環境の違いが大きく、親潮域では、大型珪藻類による顕著な植物プランクトンブルームが4~5月に発達する (Kasai et al. 1997)。一方、北太平洋外洋域の HNLC 海域では、小型の植物プランクトン生産が夏季に高くなるが、生物量の変化は微弱であり (Banse and English 1999; Tadokoro 2000)、親潮域のような珪藻類による春季植物プランクトンブルームは起こらない。しかし、植物プランクトンブルームが起こる海域と HNLC 海域では、両海域に分布する *Neocalanus* 属カイアシ類3種の生活史に明瞭な差異は無い (Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 1999, 2001a, b)。また、*Neocalanus* 属カイアシ類の個体数密度にも、海域間で明瞭な差異は認められていない (Takahashi et al. 2008)。これらの報告から、incomebreeding 型 *Calanus* 属とは異なり、capital breeding 型 *Neocalanus* 属の生活史は、植物プランクトン高生産期発達のタイミングや、規模の変動から影響を受けづらいと考えられる。

1.2.3. 気候変動に伴う生活史の季節性変化

近年、地球温暖化が海洋生態系に及ぼす影響が懸念されており、生息環境の季節変化と生物現象を関連づけて研究する生物季節学 (phenology)の研究が、長期に渡るモニタリング調査を基盤として行われている (e.g. Ellertsen et al. 1987; Mackas et al. 1998、2007、2012)。カイアシ類を対象とした生物季節学的研究の結果、気候変動に伴う季節性の顕著な変化が income breeding 型と capital breeding 型で報告されている。

Income breeding 型の *Calanus* 属カイアシ類では、1960~1984 年における北大西洋の北海とノルウェー海に分布する *C. finmarchicus* において、春季の表面水温の変化に伴い後期コペポダイト出現のタイミングが最大で 60 日変化し、水温が比較的高い年が低い年に比べ出現が早くなる傾向が認められた (Cushing 1984; Ellertsen et al. 1987)。また、海域の優占種が変化した事例も報告され、北海では水温の上昇に伴い 1962~1992 年の間に、冷水域に分布する *C. finmarchicus* の現存量が減少し、一方で温水域に分布する傾向がある *Calanus helgolandicus* が増加していた (Planque and Franmetin 1996)。*Calanus finmarchicus* と *C. helgolandicus* は交雑が可能であり、2 種の交雑種が Parent et al. (2015) によって報告されている。交雑種は通常の個体と比べ生殖能力が低い可能性が高く、交雑種の増加は 2 種の個体数減少に繋がる可能性がある。また、2 種の生活史変化は、捕食者にも影響を与えており、北海における *Calanus* 属は稚仔魚期のタラ科魚類にとって主要な餌生物であり、Beaugrand et al. (2003) は優占種が *C. finmarchicus* に比べ小型の *C. helgolandicus* に変化した影響で、近年のタラ科魚類の生産量が低下していると報告している。

Capital breeding 型の *Neocalanus* 属 3 種が生息する北太平洋では、太平洋十年規模振動 (PDO; e.g. Hare and Mantua 2000) に伴い 1970 年代と 1980 年代に大きな気候変動を観測している (e.g. Ebbesmeyer et al. 1991; Beamish et al. 1997)。1950~1990 年において、

Stn. P に分布する *N. plumchrus* の生物量変化を解析した結果では、後期コペポダイト期の生物量が年間最大値に達する期間が、1950年代では5月末~6月、1970年代では大きく遅れ7月、1990年代では最も早い5月~5月末を示した (Mackas et al. 1998)。親潮域では、*N. plumchrus* に加え *N. flemingeri* と *N. cristatus* を対象に生物季節学的な研究が行われた (Tadokoro et al. 2005; Chiba et al. 2006, 2008)。親潮域に出現するカイアシ類を、表層に出現するタイミングによって冬季-春季型、晩春-夏型、夏型に分類し、1970~1990 における試料を分析した結果、*N. flemingeri* と *N. cristatus* を含む冬季-春季型は 1970~1980 にかけて、個体数密度が年間最大値に達する期間が 3~4 月から 4~5 月に変化していた (Chiba et al. 2006)。一方、*N. plumchrus* を含む晩春-夏型は、*N. cristatus* と *N. flemingeri* とは異なり個体数密度が年間最大値に達する期間が 6~7 月から 5~6 月に変化していた。

1.3. Capital breeding 型カイアシ類生活史の未解明点

生物季節学的研究の結果、環境変化に伴い income breeding 型、capital breeding 型両方のカイアシ類の生活史が気候変動に伴い変化したことが判明した。Income breeding 型では、植物プランクトンの増殖時期や規模の変化に伴い産卵期が変動し、生活史の季節性が変化したと考えられる (Mackas et al. 2012)。しかし、capital breeding 型 *Neocalanus* 属は、産卵期間中に水温変化が乏しい深層に分布し、体内に蓄積した脂質のみを使用して産卵するため、植物プランクトン高生産期のタイミング変化に産卵期が大きな影響を受けるとは考えづらい。Capital breeding 型カイアシ類の直接的な生活史変動要因は、income breeding 型とは異なる可能性が考えられており (Mackas et al. 1998, 2007, 2012)、Mackas et al. (1998) は、*N. plumchrus* の生活史変動要因として、深層に分布するノープリウス幼生の生存可能期間が変化した可能性を示唆している。しかし、深層に分布する動物プランクトンの採集には、表層に比べ大規模な採集機器を必要とする場合が多く、採集が困難である。また、飼育実験による生態研究では、深層環境の再現が難しく、正確な研究が困難

である。さらに、深層から動物プランクトンを採集する際に、採集途中で表層環境を経験するため、深層の生理状態を維持したままの採集が難しいと報告されている (e.g. Campbell et al. 2004)。そのため、OVM を行うカイアシ類における、深層環境の生活史、生存戦略の知見は表層に比べて乏しく、capital breeding 型カイアシ類では、*Neocalanus* 属を含めた多くの種でノープリウス幼生期における生活史が未解明であり、生存戦略も明らかにされていない。

200 m 以深の深層では、太陽光が減衰するため、表層と比べ光環境が大きく異なる。そのため、可視光線の減衰によって、視覚捕食者の探餌能力が低下すると考えられ (Aksnes and Giske 1993)、表層に比べて動物プランクトンの被食リスクが軽減されると考えられる。また、表層では、多くの動物プランクトンにとって主要な餌料は珪藻類などの植物プランクトンであるのに対して、有光層以深では、十分な光合成が行えないため植物プランクトンが生息できず、糞粒や生物の死骸などで形成された沈降粒子が主要な餌料になると考えられる。表層と深層ではカイアシ類の被食、捕食環境が大きく異なり、OVM を行うカイアシ類は、深層に生息する期間、表層とは異なる環境に適応した生存戦略を持っていると考えられる。Income breeding 型と capital breeding 型カイアシ類の大きな生活史の違いは、深層の分布期間であり、income breeding 型ではコペポダイト 5 期と成体の一部のみ深層に分布するのに対して、capital breeding 型は、深層で産卵を行うためコペポダイト 5 期と成体に加えてノープリウス幼生期に深層に分布する。深層に分布する期間の長い capital breeding 型カイアシ類にとって、深層環境における生活史や生存戦略は、生存率を大きく左右する重要な要因だと考えられる。

光環境と密接に関係したカイアシ類の生存戦略として、体色変化が挙げられる。光環境の異なる生息域に分布する動物プランクトンは、同種であっても体色の差異が報告されており、視覚捕食者の摂餌差によって体色の差異が生じていると考えられている (e.g. Hairston 1979a, b; Luecke and O' Brien 1981; Vestheim et al. 2005)。*Neocalanus*

cristatus の C5 においても、250 m 以浅から採集した個体が半透明を示したのに対して、1000 m 以深から採集した個体は赤色を示し、体色の差異が報告されている (Ikeda et al. 2004)。 *Neocalanus cristatus* C5 は深層へ鉛直移動を行い、体色を変化させた可能性がある。しかし、体色変化様式について詳細な研究は行われていない。本研究では、*Neocalanus* 属 3 種において知見が乏しいノープリウス幼生期と、コペポダイト期の体色変化について研究を行い、3 種の深層における生存戦略を明らかにする。

1.4. ノープリウス幼生

ノープリウス幼生は、カイアシ類を含む、ほぼ全ての甲殻類の初期形態であり、能動的に遊泳、摂餌を行う最も初期の成長段階である。ノープリウス幼生期は以降の成長段階の個体群規模を決定する期間であり (e.g. Lopez 1996; Niehoff et al. 1999)、生活史や生存戦略の解明は重要と言える。また、海洋環境では最も個体数が多い多細胞生物の一つであり (Fryer 1987, Harvey et al. 2001)、生態系における重要な役割を持つと考えられている (e.g. Dahms and Qian 2004)。さらに、ノープリウス幼生は成体とは異なり体サイズが小さいため、口径が小さい仔魚の重要な餌資源であると考えられる。ハダカイワシ科魚類 *Diaphius theta* 仔魚や、カタクチイワシ科 *Engraulis japonicus* 仔魚の主要な餌資源は、カイアシ類のノープリウス幼生だと報告されている (Hirakawa et al. 1997; Sassa and Kawaguchi 2005)。

カイアシ類において、コペポダイト期は成体に似た形態的特徴を持つのに対して、ノープリウス幼生は成体とは異なる形態的特徴を持つ (Koga 1984)。孵化直後のカイアシ類のノープリウス幼生は無節の卵円型であり、3 対の付属脚を持ち、それぞれがコペポダイト期の第一触角、第二触角、大顎になる。第一触角は運動器官としての役割を持ち、第二触角は、運動器官としての役割の他に、基節に摂餌流を起こすと考えられる摂食補助器官を持つ。大顎は主に摂餌に使われ、咀嚼器を備える (Fernández 1979; Koga 1984)。尾部には

尾部保護装置と呼ばれる刺毛を持ち、振動感知や浮力調節を行っていると考えられている (Koga 1984)。カイアシ類では目ごとに形態的な差異が報告されており、分類することが可能である (Koga 1984)。カラヌス目は上記の形態的な特徴の他に、特有の形態的特徴として、腹部が甲殻から分離し、腹側に屈折するため、他の目と明瞭に区別することが可能である (Koga 1984)。しかし、ノープリウス幼生は形態が未発達であるため、より詳細な形態の違いを観察する必要がある種レベルでの分類は困難である。また、種同定のための形態情報の記載はコペポダイト期を対象とした報告がほとんどであり、ノープリウス幼生の形態情報は極めて乏しい。これらの要因から、カイアシ類において、ノープリウス幼生の生態学的な知見は飼育環境下の研究によるものがほとんどであり、生息環境における種ごとの個体密度や分布深度などの生態学的知見は非常に少ない。

飼育実験によって、初期ノープリウス幼生 (N1~2)の滞留時間が他の成長段階に比べ顕著に短く、N3の滞留時間が最も長いことが明らかとなった (Peterson 2001)。この特徴はカラヌス目 *Acartia* 属を除き、飼育実験を行ったカイアシ類で広く共通しており (Hart 1990; Landry 1983)、income breeding 型の *Calanus* 属では *C. finmarchicus* (Hygum et al. 2000; Campbell et al. 2001)、*C. helgolandicus* (Bonnet et al. 2009)、*C. glacialis* (Landry 1983; Peterson 2001)、*C. pacificus* (Fernández 1979; Landry 1983)、*C. sinicus* (Uye 1988)、*C. australis* (Peterson and Painting 1990)、capital breeding 型の *N. flemingeri*、*N. plumchrus* らで報告されている (Saito and Tsuda 2000)。また、成長パターンに加え、カイアシ類ノープリウス幼生に共通する特徴として、N1~2 まで卵黄に依存しながら成長し、N3 以降に摂餌を開始することが報告されている (Marshall and Orr 1955; Fernández 1979; Saito and Tsuda 2000)。しかし、capital breeding 型カイアシ類では、*N. cristatus*、*N. flemingeri*、*N. plumchrus* のノープリウス幼生を対象にした飼育実験を行った結果、*Neocalanus flemingeri* と *N. plumchrus* は多くの *Calanus* 属と同様に、餌料の存在しない濾過海水内で N3 まで成長のに対して、*N. cristatus* のみ初期コペポダイト期まで成長した

(Saito and Tsuda 2000)。Ikeda and Hirakawa (1996)は、カラヌス目 *Paraeuchaeta* 属カイアシ類 *P. elongata* ノープリウス幼生でも同様の結果が得られたと報告しており、2種は卵黄の栄養分のみでコペポダイト期まで成長できると分かった。また、他の *Paraeuchaeta* 属も含めた他の中深層性カラヌス目カイアシ類、*Chiridius armatus*、*Aetideus armatus*、*Xanthoclanus fallax* らなども同様の特徴を持つと示唆されており (Matthews 1964; Lee et al. 1974)、多くの中深層性カイアシ類に共通する特徴だと考えられる。さらに、*Calanus* 属カイアシ類では、N3 による鉛直移動が示唆されており、Durbin et al. (2000)は *C. finmarchicus* の N1~2 と N3~6 は明瞭に分布深度が異なり、後期ノープリウス幼生が表層に分布する傾向が強いと示唆している。*Calanus helgolandicus* においても、卵と N1~2 が鉛直的に広い範囲から出現したにも関わらず、N3~6 は温度躍層以浅から出現し、主に N3 で鉛直移動を行うと報告されている (William et al. 1987)。Uye et al. (1990)や Huang et al. (1992 and 1993)らも *Calanus sinicus* を対象とした研究において、卵を採集した深度と同深度から初期ノープリウス幼生が採集され、さらに、N4~6 は 20 m 以浅から出現したことから、N3 で鉛直移動を行っているとし唆している。これらの結果から、N3 における鉛直移動は、上記の *Calanus* 属カイアシ類に共通する特徴である可能性が高い。N3 は N1~2 に比べ消化管や筋組織が顕著に発達し (Peterson 2001)、また、遊泳器官である第一触角の端節背部に新たに棘毛を獲得するため (Koga 1984)、内部、外部形態ともに形態が変化し、消化器官や運動能力が大きく発達する成長段階だと考えられる。Marshall and Orr (1955)、Fernández (1979)らによる飼育実験では、income breeding 型カイアシ類の *C. finmarchicus*、*C. pacificus* を濾過海水内で餌を与えず飼育した結果、ノープリウス幼生は N4 以降へ成長出来なかったことを報告している。N3 の餌料環境は、死亡率に大きな影響を及ぼすことが報告されており、*C. pacificus* ノープリウス幼生を用いて、N3 に成長した直後に餌の供給を開始した場合と、餌の供給を 10 時間遅れさせた場合とで死亡率の比較を行った結果、後者の死亡率は顕著に高かった (Lopez 1996)。*Calanus* 属ノープリウス幼生

の飢餓耐性は、最長で約 11 日間以下と考えられており、*C. pacificus* で 1 週間 (Fernández 1979)、*C. finmarchicus* と *C. helgolandicus* で約 8~11 日 (Cook et al. 2007)、濾過海水内で生存した飼育報告が存在する。Capital breeding 型の *Neocalanus* 3 種ノープリウス幼生は、濾過海水内で 2 カ月間以上生存したと Saito and Tsdua (2000) は報告している。3 種の *Neocalanus* 属ノープリウス幼生は income breeding 型カイアシ類に比べ飢餓耐性が高く、餌料が乏しい深層環境に適応した生存戦略を持つと考えられる。

Capital breeding 型カイアシ類のノープリウス幼生は、income breeding 型とは異なる上記の特徴を持ち、さらに雌成体が深層で産卵を行うため、ノープリウス幼生期に表層へ鉛直移動を行うと考えられる。鉛直移動のタイミングによってコペポダイト期の死亡率や成長速度が大きく変化する可能性があり、初期生活史は *Neocalanus* 属にとって適応度を大きく変化させる要因を含む重要な期間であり、解明の必要性は高い。

1.5. 体色変化

動物プランクトンの体色は、死亡すると消失、または変色する。また、ホルマリンやエタノールで固定した場合、短時間で消失してしまうため、従来の生態学的研究方法では体色の解析は困難であった。これまで行われてきた、動物プランクトンの体色研究方法は大きく分けて、色素を溶媒で抽出し分析する方法と、採集直後の生体を撮影する方法があった (e.g. Czczuga 1960; Vestheim et al. 2005)。動物プランクトンの体色は、赤色、紫色、橙色、黄色、緑色、青色などが報告されており (Hairston 1979a, b; Herring and Roe 1988, etc)、主要な色素はアスタキサンチン由来の化合物だと報告されている (Snoeijs and Haubner 2014)。アスタキサンチンは、タンパク質と結合することで上記の色彩を示す色素になる (Britton et al. 1997)。また、動物プランクトンの体内では、アスタキサンチン色素は単体か、脂肪酸と結合したモノエステル体、ジエステル体の 3 形態で存在する (Snoeijs and Haubner 2014)。アスタキサンチン合成には β -carotene などの前駆体となる色素が必

要となる、しかし、動物プランクトンはこれらの色素を合成することが出来ないので、植物プランクトンを摂餌し、外部から取り込む必要があると考えられている (Matsuno 2001)。一般的な、カイアシ類では β -carotene \rightarrow zeaxanthin \rightarrow β -doradexanthin (adonixanthin) \rightarrow アスタキサンチンの経路で合成する (Katayama et al. 1973; Rhodes 2007)。しかし、ハルパクチクス目カイアシ類では合成経路が一部異なると報告されており、*Nitokra lacustris* では β -carotene \rightarrow echinenone \rightarrow canthaxanthin \rightarrow アスタキサンチンの順に合成する (Rhodes 2007)。アスタキサンチンは動物プランクトンにとって主要な色素であるだけでなく、高次捕食者にとって重要な栄養分であり、ビタミン A の前駆体となる (Liñán-Cabello et al. 2002)。魚類はアスタキサンチンを体内で合成できないので、動物プランクトンの摂餌が主要な補給手段である (Torrissen and Christiansen 1995)。魚類はアスタキサンチンが欠乏することによって深刻な影響をうけると考えられ、バルト海における太平洋サケ (*Salmo salar* L) は、M74 シンドロームと呼ばれる稚仔魚のアスタキサンチンやチミンの欠乏によるへい死が近年報告されている (Amcoeff et al. 1998; Petterson and Lignell 1998)。

動物プランクトンでは、同種内で体色が異なる個体群が確認されている。北米の湖沼に生息する淡水性のカラヌス目ディアプトムス科カイアシ類 *Diaptomus nevadensis* は、分布する湖沼によって体色の差異が報告されており、赤色と淡青色を示す個体群が存在する (Hairston 1979a, b, 1981)。また、ヨーロッパ大陸の Bialystok 域におけるカラヌス目カイアシ類 *Hemidiaptomus amblyodon*、*Diaptomus castor* らでも分布する湖沼によって赤色と青色を呈する個体群がそれぞれ分布している (Creczuga and Czerpak 1966)。さらに、Luecke and O' Brien (1981) は、アラスカの Toolik Lake 域において、赤色と緑色を呈するカラヌス目カイアシ類 *Heterocope septentrionalis* が異なる湖にそれぞれ分布していると報告している。海洋の動物プランクトンでは、深層性の十脚類で体色の差異が報告されており、*Sergestes lucens* や *Systellaspis debilis* で赤色の度合いが異なる個体が存在する (Herring and Roe 1988)。また、Vestheim et al. (2005) は、カラヌス目カイアシ類

Paraucheate norvegica で、赤色と半透明個体の存在を報告している。水中の光環境は、深度、時刻、溶存物質、濁度などの多岐に渡る要因によって変化するため (Johnsen 2002)、動物プランクトンの体色変化は、変動の激しい光環境に適応した生存戦略の 1 つだと考えられる。これまでの研究の結果、以下の 2 つが体色変化の主な誘因要因だと示唆されている。

アスタキサンチンは高い抗酸化作用をもつ物質であるため (Edge et al. 1997)、動物プランクトンはアスタキサンチンを蓄積し、体色を変化させることで紫外線などの短波長光から細胞を防御していると示唆されている (Hairston 1976; Goodwin 1986; Miki 1991; Hansson 2000)。太陽光は、植物生産に必須である反面、紫外線は、DNA 損傷を引き起こすため、生物にとって有害である (Sinha and Häder 2002)。また、Storz and Paul (1998) による実験では、淡水性枝角類 *Daphnia magna* は、260~380 nm 波長光に対しては忌避行動を示すことから、動物プランクトンは光化学反応により細胞の酸化作用を引き起こす短波長光を忌避していると考えられている。Hairston (1976) による飼育実験では、450 nm 波長光を照射して淡水性カラヌス目カイアシ類 *D. nevadensis* を 10 日間飼育した結果、半透明個体群は 5 日目で死滅したのに対して、アスタキサンチン色素を持つ一部の個体は 10 日間生存した。また、*D. nevadensis* は生息する湖沼の水深が浅いほど、赤色を示す個体が多いと示唆されている (Hairston 1979a; Byron 1982)。さらに、淡水性カイアシ類では、紫外線が強い高緯度域に分布するカイアシ類ほど、赤色を持つ種が多い傾向が認められている (Persand et al. 2007)。飼育実験によって、光環境の変化に伴う、動物プランクトンのアスタキサンチン含有量や体色の変化が認められた研究例が複数存在し、Mori and Dhugal (2008) による端脚類 *Vibilia stebbingi* を用いた飼育実験では、昼光色蛍光灯光、赤色光、紫外線をそれぞれ 30 分間照射した結果、全ての条件で、体色の暗色化や模様の変化を観察した。また、異なる湖沼に分布する赤色と緑色の *Heterocope septentrionalis* を、同じ光条件下で培養した結果、培養 5 日目から緑色個体の体色変化が始まり、10 日後には体色が淡い

赤色に変化した (Luecke and O' Brien 1981)。さらに、Luecke and O' Brien (1981)は、緑色から赤色に変化した個体は、変化を経験しなかった個体とくらべ 6~8 日長く生存したと報告している。

動物プランクトンが主に生息する漂泳環境は、姿を隠せる構造物がなく、捕食圧を低下させるため、動物プランクトンの一部は自身を隠蔽する体色を持つと考えられている (Johnsen 2002)。ニューストーン性の十脚類 *Prapenaeus* sp.、*Hippolyte coerulea* やカラマス目 *Pontella* 属カイアシ類は淡青色の体色を持つことが知られており、これは、表層光環境において隠蔽効果があると考えられている (Herring and Roe 1988)。また、体色を持つ個体と比べ、体色を持たず、光の透過率が高い半透明体を持つ個体で、より高い隠蔽性が認められており (Johnsen 2002)、海洋の有光層に分布する動物プランクトンの多くは半透明である (Herring and Roe 1988; Johnsen 2001)。体色によっては逆に視覚捕食者のターゲットになり易く被食リスクが増加する場合もあり、有光層の光環境では、赤色を呈する動物プランクトンの被捕食圧が、無色、または青色を持つ個体より高いことが報告されている (Hairston 1979a; Luecke and O' Brien 1981; Utne-Palm 1999)。そのため、赤色を持つ淡水性カイアシ類の多くは、視覚捕食者の少ない湖沼で優占する傾向がある (Hansson 2004; Hylander et al. 2009)。Hairston (1979a)による研究では、北米における *D. nevadensis* は、視覚捕食者が少ない湖沼で赤色、多い湖沼で青色の個体が優占すると報告している。また、Hansson (2000)による実験では、ディアプトムス科カイアシ類を異なる明暗条件下で 95 時間飼育した結果、アスタキサンチン含有量に有意な差異が認められ、明条件で飼育した個体が 7%高かった。しかし、上記培養条件で明条件群に視覚捕食者を加えた結果、アスタキサンチン含有量に明瞭な差異は認められなかった。動物プランクトンの体色において、有害光に対する防御効果と視覚捕食者に対する隠蔽効果には、トレードオフの関係が成り立つと考えられており (Hansson 2000, 2004)、動物プランクトンは、光環境や視覚捕食者の有無によって、好適な体色を呈していると考えられている。

OVM を行うカイアシ類は、表層から深層へ大規模な鉛直移動を行うため、多様な光環境を経験する。また、OVM を行うカイアシ類の多くは、深層へ移動した後に休眠する (Conover 1988)。休眠中は、代謝機能の低下に加えて、物理刺激に対する反射行動の鈍化が報告されており (Hirche 1983; Ikeda et al. 2004)、捕食者からの逃避能力が低下すると考えられる。これらの特徴から、OVM を行うカイアシ類にとって体色変化と、それに伴う隠蔽効果は生存率を左右する重要な生存戦略の 1 つだと考えられる。北太平洋亜寒帯域に生息する *Neocalanus* 属 3 種では、体色の差異が報告されたのは *N. cristatus* のみであり (Ikeda et al. 2004)、3 種は、体色変化を用いた異なる生存戦略を持っている可能性が高い。3 種の生存戦略を理解するために、体色変化様式の解明は必要不可欠であると考えられる。

1.6. 本研究の目的

多くの先行研究の結果、カイアシ類は異なる生息環境に適応した生活史を持ち、income breeding 型と capital breeding 型が存在することが明らかになった。また、生物季節学的な研究も行われ、気候変動に伴い生活史が変化することが判明した。しかし、カイアシ類の深層環境における生態学的知見は表層に比べると乏しく、特に深層の滞在期間が長い capital breeding 型カイアシ類では生活史、生存戦略に未解明な部分が存在する。本研究は、代表的な capital breeding 型カイアシ類である、北太平洋亜寒帯域に生息する *Neocalanus* 属カイアシ類 3 種を用いて、これまで研究報告が乏しかった *Neocalanus* 属のノープリウス幼生期における初期生活史と、コペポダイト期の体色変化に関する研究を行い、*Neocalanus* 属 3 種の生活史と生存戦略の特徴を明らかにすることを目的とする。まず、初期生活史の研究では、従来の形態情報を用いた分類方法による *Neocalanus* 属 3 種ノープリウス幼生の分類は困難なため、形態情報を使用しない分子生物学的手法を用いた同定方法の確立を行った。そして、親潮域にて、年間をとおして採集したノープリウス幼生を使用し、3 種を分類し、種ごとに初期生活史の解明を行った。体色変化の研究では、体色の差異が報告され

た成長段階を対象に、採集直後の個体の写真を撮影した。画像を解析することで体色変化の有無を解析し、体色変化の生存戦略について考察を行った。総合考察では、本研究によって得られた新たな知見と従来知見を考慮し、*Neocalanus* 属 3 種の生活史の違いと、生存戦略の特徴を明らかにする。

2章: Real-time PCR を用いた *Neocalanus* 属カイアシ類ノープリウス幼生

の種同定方法について

2.1. 緒言

カイアシ類を含め多くの動物プランクトンの種同定は、これまで種特異的な形態を顕微鏡下で観察することにより行われてきた。しかし、形態情報を基にした正確な種同定のためには、専門性の高い知識と、解剖や染色などの技術を習得する必要があり、一定期間の経験を積むことが必要不可欠である。また、熟練した研究者でも、形態情報の知見が少ないノープリウス幼生を対象とした場合、正確な種同定は成体と比べ困難となる。本研究の研究対象種である北太平洋亜寒帯域に生息する 3 種の *Neocalanus* 属カイアシ類では、Campbell (1934)によって、*N. plumchrus* のみノープリウス幼生の形態が報告されている。しかし、Pinchuk (1997)は、Campbell (1934)が記載したノープリウス幼生の形態的な特徴が、*Metridia pacifica* と酷似していると指摘しており、*M. pacifica* のノープリウス幼生を *N. plumchrus* として誤って報告した可能性が示唆されている。Saito and Tsuda (2000)は、*Neocalanus* 属 3 種の卵と孵化直後のノープリウス幼生が、それぞれ異なる体色と油滴の散在パターンを持ち、顕微鏡を用いた観察によって 3 種を分類できると報告している。しかし、油滴や体色は試料をエタノールで固定した場合は直後に、ホルマリンで固定した場合でも数カ月間以内で消失するため、有効な種同定の基準とは言えない。

分子生物学的手法は、バクテリアや原生動物の主要な種同定方法であり (e.g. Brown et al. 1999; Hebert et al. 2003)、形態情報を使用しない種同定が可能である。主に DNA barcoding 法 (PCR sequence)、fluorescence in situ hybridization 法 (FISH 法)、PCR 法の 3 つの分子生物学的手法が、カイアシ類を含めた動物プランクトン幼生、魚類の卵や稚仔魚の種同定方法として使用されている (e.g. Bucklin et al. 2000; Teletchea 2009)。

DNA barcoding 法 (PCR sequence)による種同定は、短い塩基配列 (300~800 bp)を解

析し、種を判別する手法である。DNA barcoding 法は、蓄積された情報量が最も多く、使用例が多い分子生物学的種同定方法であり、形態的な差異が乏しい隠蔽種の発見にも利用されている (e.g. Bucklin et al. 2010, 2011; Laakmann et al. 2012)。しかし、塩基配列の決定作業 (シーケンス解析) は、シーケンス解析に先駆けて試料から DNA を抽出し、特定の領域を PCR にて増幅する必要がある。また、塩基配列を決定した後は、適切なモデルを選択し系統解析を行う必要があるため、DNA barcoding 法は、同定結果を得るまでに多くの時間を必要とする。

FISH は in situ hybridization 法 (ISH 法) の一つであり、微生物や植物プランクトンの種同定に用いられる同定方法である。FISH では、試料から DNA を抽出せずに、蛍光物質を標識した目的生物に特異的に結合するプローブを直接細胞に結合させることによって同定を行う (e.g. Gasoll and DelGiorgio 2000)。近年では、FISH を用いた動物プランクトンや、その幼生の種同定方法が確立され、精度の高い解析が可能だと報告されている (LeGoff-Vitry et al. 2007; Pradillon et al. 2007; Henzler et al. 2010)。他の同定方法にはない FISH 特有の利点として、DNA の抽出を行わないため、解析時間短縮に加えて、試料の破碎や抽出といった操作がないため、分子生物学的な解析後に形態情報の再検証が可能である点が挙げられる。また、FISH 解析後の試料から DNA を抽出し、DNA の解析を行うことも可能である (Henzler et al. 2010)。さらに、DNA barcoding 法に比べ解析費用が安価である上、画像解析を用いた、自動的な目的種個体数算出方法の開発が進められており (Henzler et al. 2010)、FISH は迅速かつ安価な種同定方法となり得る可能性を秘めている。しかし、FISH では、試料の劣化による同定精度の低下が報告されている (Henzler et al. 2010)。FISH を使用し、高い精度で同定を行うには、死亡する前に試料を固定する必要がある (LeGoff-Vitry et al. 2007; Pradillon et al. 2007; Henzler et al. 2010)。一般的に、動物プランクトンはプランクトンネットを使用して採集する。採集中のネット内では、試料はコッドエンドに高密度に凝集するため、試料の生存率が高いとは考えづらい。また、本

研究の研究対象種である外洋性種を採集するには、鉛直的に広い範囲から試料を採集する必要がある。深層から採集した試料は、ネット内で長時間凝集し、また、表層に運ばれる間に大きな水温変化を体験するため、表層から採集した試料に比べて体の欠損など、明瞭な状態悪化が観察できることが多く、生存率はさらに低いと考えられる。

PCR を用いた種同定方法は、種特異的に結合するプライマー、またはプローブを用いて目的種の塩基配列のみを増幅し、電気泳動によって増幅配列を確認することで種同定を行う手法である。PCR 法は、最も広く使用されている分子生物学的種同定方法であり、種特異的な一組のプライマーを使用し種同定を行う *specie-specific PCR 法* (e.g. Bucklin et al. 1999; Hill et al. 2001; Grabbert et al. 2010; Gaonkar et al. 2015) や、プライマーを複数組使用する *multiplex PCR 法* (Michelini et al. 2007)、*specie-specific PCR 法* に先駆けて目的配列を含む領域を予め増幅する *2-step nested PCR 法* (Deagle et al. 2003) などが存在する。また、種特異的なプライマー、プローブを必要としない手法に *Restriction fragment length polymorphism; RFLP*、*Random amplified polymorphic DNA; RAPD* が存在し、幼生を含めた動物プランクトンの種同定に利用されている (Coffroth and Mulawka 1995; André et al. 1999; Lindeque et al. 1999, 2004, 2006; Holmborn et al. 2011)。RFLP は、制限酵素を使用し、特定の領域を増幅した PCR 産物を断片化する手法である。制限酵素は特定の配列のみを切断するため、断片化した PCR 産物は種ごとに、特有の数、長さを示す。RAPD は、既存の短いプライマーを使用し PCR を行う手法である。プライマーは、DNA にランダムに結合し、増幅産物を生成する。DNA 配列の異なる種によって、特異的な増幅産物が生成される。しかし、これらの手法では、PCR 解析や制限酵素処理の後、電気泳動し増幅産物を確認する必要がある。そのため、同定の結果を得るまで 2 回以上の実験操作を行う必要がある。実験系において、分析手順が複雑化する場合、コンタミが生じる可能性が高くなる。また、動物プランクトンの生活史を研究するには、長期に渡り継続的な採集を行い、さらに、鉛直的に広い範囲を層別に採集する必要があり、分析対象となる試料

数が大規模となる。多試料の分析が求められる研究では、簡便かつ短時間で結果が得られる方法であるほど、分析できる試料数が増加し、より正確な結果が得られると考えられ、手順が複雑な手法は適切な分析手段とは言えない。

近年、PCR 分析中に増幅する PCR 産物量をリアルタイムに測定する real-time PCR 法が確立され、魚類の卵や稚仔魚、動物プランクトン幼生の種同定に用いられている (Taylor et al. 2002; Watanabe et al. 2004; Fox et al. 2005; McBeath et al. 2006; Vadopalas et al. 2006; Pan et al. 2008; Minegishi et al. 2009; Wright et al. 2009; Jungbluth et al. 2013; Wang et al. 2015)。Real-time PCR 法は、上述の PCR 法を用いた同定方法とは異なり 1 つの実験手順で PCR 分析と増幅産物の定量を同時に行うため、簡便かつ迅速な種同定が可能である。また、real-time PCR を使用することで、採集試料中の目的種を同定すると共に、目的配列コピー数の推定を行う定量分析 (qPCR) が可能になる。qPCR は、目的種から抽出した DNA を用いて検量線を作成し、採集試料から網羅的に抽出した DNA における目的配列コピー数を推定する分析方法である。qPCR の利点は、他の分子生物学的な種同定方法とは異なり、PCR 操作前のソーティングや、個別別に DNA の抽出を行う必要がなく、一度の分析で、種同定と目的配列コピー数の推定が同時に行える点である。この利点から、qPCR は効率的な動物プランクトンの分析方法と考えられ、多くの生態学的研究に使用されている (McBeath et al. 2006; Vadopalas et al. 2006; Pan et al. 2008; Wright et al. 2009; Hunter et al. 2012; Jungbluth et al. 2013; Wang et al. 2015)。しかし、網羅的に DNA を抽出する qPCR は総現存量の指標であり、個体数や成長段階に関する情報を含まない。個体群生態学は生物の個体数を基礎として発展した学問である。特に生活史の研究には、成長段階の情報が必要不可欠であり、この点は qPCR の欠点と言える。そこで、本研究では、real-time PCR を用いた、qPCR とは異なるノープリウス幼生同定方法を確立する。本研究の手法では、real-time PCR 操作前に、カラヌス目ノープリウス幼生に共通した形態的特徴を用いて (Koga 1984)、顕微鏡下で各成長段階へ分類、計数した。さらに、DNA を各個体

から抽出し、real-time PCR による種同定を行う。種特異的なプローブ、プライマーのターゲット領域には、多くの後生動物で、種を判別するに十分な変異が認められているミトコンドリア DNA (mtDNA) の COI 領域を使用した (Hebert et al. 2003)。Real-time PCR の出力値 (C_q 値) は、目的種特異的なプローブ、プライマーを使用した場合、目的種以外では増幅が起こらず C_q 値が算出できないか、増幅されたとしても PCR 効率が悪く C_q 値は目的種と比べ顕著に高い値を示す。そのため、目的種のみを明瞭に区別する基準 C_q 値を設定し、目的種と他種の判別が可能になると考えられる。

本章では、real-time PCR による種同定方法を確立するため、まず *Neocalanus* 属 3 種の COI 領域を特異的に増幅するプライマーとプローブを作成し、ノープリウス幼生の種同定方法を述べる。さらに、親潮域から採集した天然個体群のノープリウス幼生を用いて real-time PCR 分析とシーケンスによる種同定を併用し、開発した手法の精度を検証した。

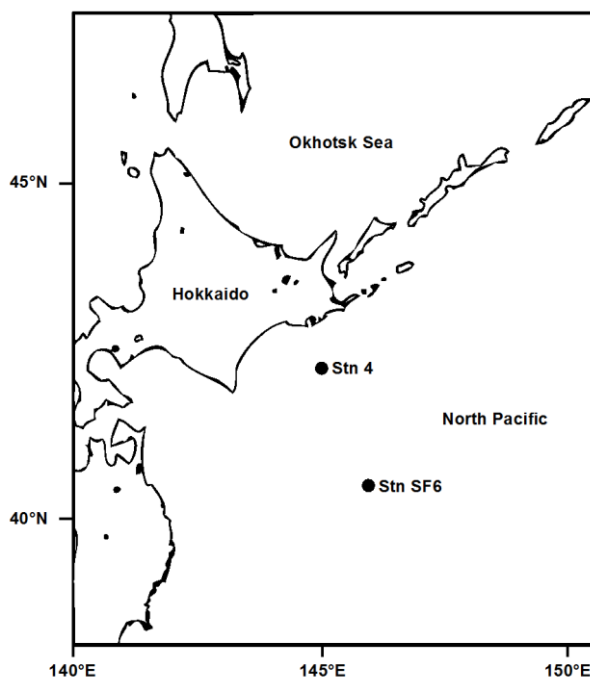


Fig.1. Location of sampling sites (Stn 4 and Stn SF6) in the Oyashio region.

2.2. 材料と方法

2.2.1. 採集方法

動物プランクトン試料は、独立行政法人水産総合研究センター東北区水産研究所若鷹丸及び北海道区水産研究所北光丸に乗船し、2009年10月、2010年の1月、3月、4月、5月に西部北太平洋亜寒帯、親潮域の測点A4、SF6にて採集した (Fig. 1)。採集には、Norpac ネット (目合: 100 μm 、開口面積: 0.16 m^2 、Motoda 1957) または VMPS (Vertical Multiple Plankton Sampler, 目合: 100 μm 、開口面積: 0.25 m^2 , Terazaki and Tomatsu 1997) を使用し、0~20, 20~50, 50~100, 100~200, 200~500, 500~1000, 1000~1500, 1500~2000 m から層別採集を行った (Table 1)、なお、3、4、5月の採集では2000 m まで測器が到達せず、ネットの最深到達深度が2000 m 以浅となった。Norpac ネットには濾水計を装着し濾水量を測定した、一方、VMPS には装着せず、濾水率を100%と仮定した。試料は採集から1時間以内に95%エタノールで固定し、試料の劣化を防ぐため固定から24時間後にエタノールの交換を行った。

Table 1. Zooplankton sampling date and local time in the Oyashio region. HK: FRV *Hokko Maru*, WK: FRV *Wakataka Maru*, N: Norpac net, V: VMPS net.

Ship	Station	Sampling time	Date	Net	Sampling layers (m)
HK	Stn A4	05:29-10:19	10/12/2009	N	0-20, 20-50, 50-100, 100-200, 200-500, 500-1000, 1000-1500, 1500-2000
HK	Stn A4	10:03-04:20	01/22-23/2010	N	0-20, 20-50, 50-100, 100-200, 200-500, 500-1000, 1000-1500, 1500-2000
WK	Stn A4	18:53-20:46	03/05/2010	V	0-20, 20-50, 50-100, 100-200, 200-500, 500-1000, 1000-1500, 1500-1944
WK	Stn SF6	03:52-05:37	04/21/2010	V	0-20, 20-50, 50-100, 100-200, 200-500, 500-1000, 1000-1500, 1500-1887
WK	Stn A4	23:21-01:28	05/13/2010	V	0-20, 20-50, 50-100, 100-200, 200-500, 500-1000, 1000-1500, 1500-1923

2.2.2. プライマー、プローブの設計

Neocalanus 属 3 種と同所的に分布する他種カイアシ類の COI 領域シーケンスデータは GenBank から収集した (Table 2)。これらのシーケンスデータを用い Clustal X 2.0 (Larkin et al. 2007) でアライメントを行った後、mPrimer3 (Koressaar and Remm 2007) を使用し、*N. cristatus* ノープリウス幼生判別用のプライマーとプローブセット *Necr*、*N. flemingeri* small form (*N. flemingeri* S) 用の *Nefl*、*N. plumchrus* 用の *Nep1* の候補となる領域をそれぞれ選定した。最低限の選択基準として、2 塩基以上の目的種特異的な配列を含む領域を候補領域として選択した。また、以下の基準を可能な限り満たす候補領域を選別した; (1) 目的種の種内変異領域を含まない、(2) Forward または Reverse プライマーの候補領域 5 末端 3 塩基中に 1 塩基以上の目的種特異的な配列を含む、(3) ヘアピン結合を避けるため、G と C 塩基を 3 塩基以上連続して含まない。上記 3 つの基準の他に

Table 2. COI sequences from GenBank aligned using Clustal X 2.0 to design a species specific primer pair and probe for *Neocalanus* spp..

Species	Accession number
<i>Calanus pacificus</i>	AB379975
<i>Eucalanus bungii</i>	AY371083
<i>Metridia asymmetrica</i>	AB380001
<i>Metridia pacifica</i>	AB379983
<i>Neocalanus cristatus</i>	AB526894
	AB526895
	AB526896
<i>Neocalanus flemingeri</i>	AB526883
(small form)	AB526885
	AB526888
<i>Neocalanus flemingeri</i>	AB526881
(large form)	AB526882
	AB526884
<i>Neocalanus plumchrus</i>	LC005586
	LC005587
	LC005588
	AB526899
	AB526903
<i>Paracalanus parvus</i>	AF474110
<i>Pleuromamma scutullata</i>	AB379991
<i>Pseudocalanus newmani</i>	JX502997
<i>Pseudocalanus minutus</i>	AF332794

Nefl を作成する際は、目的種の *N. flemingeri* S と、*N. flemingeri* large form (*N. flemingeri* L) を判別するため以下の基準をさらに追加した (4) Forward または Reverse プライマーの

候補領域 3 末端に 1 塩基以上 *N. flemingeri* L には無い *N. flemingeri* S 特異的な配列を含む。以上の条件を満たした候補領域を、Eurofins Operon Japan にて合成し、プローブには 5 末端に蛍光色素 (FAM)、3 末端にクエンチャー色素 (TAMRA)、または、Blackhole quencher (BHQ) を装飾した。また、形態情報を基に種同定を行った各目的種の雌成体を使用し、段階希釈法によって各プローブ、プライマーセットの PCR 効率を算出した (e.g., Pfaffl 2001)。

Table 3. DNA concentration and specificity of the *Neocalanus*-specific primer pair and probe for 16 species of copepods. Four or five individual copepods were used for each species. Results are the proportion(%) of individual with detectable amplification in all triplicate real-time PCR test and mean (\pm standard deviation) of measured C_q values provided in parentheses.

Species	DNA	triplicate test	triplicate test	triplicate test
	concentration (ng ml ⁻¹ \pm SD)	with Nocr	with Nefl	with Nepl
<i>Calanus pacificus</i>	527 \pm 142	0	0	0
<i>Microcalanus pygmaeus</i>	112 \pm 21.9	0	0	20 (35 \pm 0)
<i>Paracalanus parvus</i>	520 \pm 87.6	0	0	0
<i>Pseudocalanus minutus</i>	1140 \pm 301	0	0	0
<i>Pseudocalanus newmani</i>	700 \pm 59.1	0	0	60 (35 \pm 0)
<i>Eucalanus bungii</i>	1360 \pm 1220	0	40 (38.0 \pm 1.60)	0
<i>Gaetanus simplex</i>	1150 \pm 107	0	0	0
<i>Gaidius variabilis</i>	903 \pm 488	0	0	0
<i>Metridia asymmetrica</i>	665 \pm 182	0	0	0
<i>Metridia pacifica</i>	183 \pm 72.2	0	0	0
<i>Metridia okhotensis</i>	333 \pm 107	20 (33.4 \pm 0.61)	20 (39.4 \pm 0.86)	40 (35 \pm 0)
<i>Neocalanus cristatus</i>	3500 \pm 1180	100 (22.8 \pm 0.24)	0	60 (34 \pm 0.75)
<i>Neocalanus flemingeri</i> S	1080 \pm 404	0	100 (24.2 \pm 2.03)	0
<i>Neocalanus flemingeri</i> L	981 \pm 186.7	ND	100 (32.5 \pm 3.64)	ND
<i>Neocalanus plumchrus</i>	593 \pm 250	0	0	100 (23 \pm 0.46)
<i>Pleuromamma scutullata</i>	716 \pm 91.1	0	0	0
<i>Spinocalanus</i> spp.	134 \pm 90	0	20 (40 \pm 0)	0

2.2.3. プライマー、プローブの種特異性評価

プライマーとプローブの種特異性を評価するため、採集試料から親潮域に優占するカイアシ類 16 種の雌成体、各種 5 個体を用い、各プローブ、プライマーの特異性を検証した (Table 3)。 *Neocalanus flemingeri* の雌成体は、前体部長 (mm) の測定を行い、4.2 mm 以下を示した個体を *N. flemingeri* S、4.5 mm 以上を示した個体を *N. flemingeri* L として分類し (Tsuda et al. 1999 and 2001)、4 個体を検証に使用した。分類したカイアシ類は、小型種 (*Calanus pacificus*, *Microcalanus pygmaeus*, *Paracalanus parvus*, *Pseudocalanus minutus*, *P. newmani*) からは 1 個体全て、大型種 (*Eucalanus bungii*, *Gaetanus simplex*, *Gaidius variabilis*, *Metridia asymmetrica*, *M. pacifica*, *M. okhotensis*, *N. cristatus*, *N. flemingeri*, *N. plumchrus*, *Pleuromamma scutullata*, *Spinocalanus* spp.) からは後体部を、それぞれを用いて DNA を抽出し、DNA 濃度を Qubit® 2.0 フルオロメーター (Invitrogen Inc) と Qubit™ dsDNA HS Assay Kits (Invitrogen Inc.) を使用して測定した。作成した目的種特異的なプローブ、プライマーを使用し、一頭体ごとに 3 回 real-time PCR を行った。

2.2.4. ノープリウス幼生の DNA 試料作成方法

ノープリウス幼生の種組成は、近縁海域からの移流や、生活史の違いなどから、季節的に大きく変動すると考えられる。季節や深度によって、作成したプローブ、プライマーに対して高い特異性を示す他種が混在し、同定精度に大きな影響を及ぼす可能性がある。そこで、本研究では親潮域において、3 種の *Neocalanus* 属ノープリウス幼生が出現する期間中、網羅的に同定精度を検証するため、2009 年の 10 月、2010 年の 1 月、3 月、4 月、5 月に層別採集した動物プランクトン試料を使用した。試料は、実体顕微鏡で形態の観察を行い、腹部が甲殻から明瞭に分離し、腹側に屈折するカラヌス目ノープリウス幼生を選別し、Koga (1984) の形態情報をもとに各成長段階に分類した (Table 3)。N1 と N2 は、第一

触角末端節の背部に棘毛が存在しないため、他の成長段階と区別できる。また、N3以降のノープリウス幼生は一对以上の尾刺毛を有するため、尾刺毛数からも区別が可能である。N2は第1触角末端節の先端部に棘毛を4本有するため、3本の棘毛を有するN1と判別できる。N3とN4は第一触角末端節の背部に、それぞれ、2本と4本の棘毛を有するので判別できる。N5とN6は第一触角末端節の背部の棘毛数が4本以上であり、N6のみが明瞭な遊泳脚を持つため他の成長段階から分類が可能である。各成長段階に分類した後、各採集層から10~20個体のノープリウス幼生を無作為に選別し分析対象とした。分類したノープリウス幼生の個体数が目的個体数以下だった場合は、分類した全ての個体からDNAを抽出した。

DNAの抽出を行った計2697個体中、DNA濃度がQubit® 2.0フルオロメーター(Invitrogen Inc)の検出限界値以下を示し(0.5 ng mL⁻¹以下)、測定ができなかった42個体を除いた計2655個体でreal-time PCR分析を行った。各ノープリウス幼生から抽出したDNA濃度の平均は338 ng mL⁻¹だった。

Table 4. Stage specific characteristics of calanoid copepod nauplii (Koga 1984).

	N1	N2	N3	N4	N5	N6
Number of distal setae on end segment of antennule	3	4	>4	>4	>4	>4
Number of dorsal setae on end segment of antennule	0	0	2	4	≥4	≥4
Number of spines on caudal armature	2	2	>4	>4	>4	>4
Maxillule	absent	absent	absent	present	present	present
Swimming leg	absent	absent	absent	absent	absent	present

2.2.5. ノープリウス幼生の種同定方法

特異性の高いプローブとプライマーを使用し real-time PCR を行った場合、目的種は非目的種に比べ低い C_q 値を示すため判別可能だと考えられる。しかし、抽出物の DNA 量に依存して、 C_q 値は変化するため、ノープリウス幼生が目的種でも、DNA 量が低い場合、算出される C_q 値は高い値を示す。DNA 量の差異に影響を受けず C_q 値を比較するため、DNA 濃度と C_q 値の関係式 (判別式) を求めた。

判別式は、形態情報を基に分類した雌成体の DNA 試料を使用し作成した。DNA 試料は、15 段階 (3000、2000、1000、800、600、400、300、200、150、100、80、60、40、20、10 ng mL^{-1}) に希釈し、目的種のプローブ、プライマーセットを用いた real-time PCR により各希釈段階につき 3 回 C_q 値の測定を行った。測定結果は、x 軸を対数変換した DNA 濃度 (ng mL^{-1})、y 軸を C_q 値としたグラフにプロットし、最小二乗法により判別式を作成した。判別式を使用することで、ノープリウス幼生が目的種の場合に算出される C_q 値を推定できる。ノープリウス幼生が目的種の場合では、測定された C_q 値が推定値に近い値を示し、一方で目的種以外では推定値と大きく異なる C_q 値を示すと考えられる。本研究では、推定 C_q 値と測定 C_q 値の差の絶対値を $|\Delta C_q|$ 値として、目的種の種同定に使用する。各分析方法の詳細を以下に記述する。

各個体から Schizas et al. (1997) を改変した方法を用いて DNA を抽出した。抽出は、1.5 mL チューブにノープリウス幼生と 10 μL の PCR バッファーを加え 94°C で 2 分間インキュベートした。そして、1.0 μL のプロテアーゼ K 酵素 (Qiagen) を試料に加え、55°C で 15 分、70°C で 10 分間インキュベートし、試料のタンパク質を分解した。その後、10 μL の GeneReleaser (BioVentures Inc.) を試料に加え、GeneReleaser のマニュアルで推奨されている温度条件でインキュベートした。試料は、15,000 x g で 1 分間遠心し、上澄み 10 μL を TE バッファー 10 μL に希釈し、以降の実験に使用する DNA 試料とした。試料の DNA 濃度は、Qubit® 2.0 フルオロメーター (Invitrogen Inc) を使用して測定した。Real-time

PCR による分析は、1 試料につき、各目的種用のプライマー、プローブセットごとに 1 回行った。全ての real-time PCR 分析は、LightCycler®480 (Applied Roche)を用いて行い、反応液は、LightCycler®480 Probe Master Mix (Applied Roche)を 10 μL , Forward と Reverse プライマー (4 μM)とプローブ (8 μM)をそれぞれ 0.8 μL , PCR grade H_2O を 6.60 μL ,そして、DNA 試料を 1.0 μL の計 20 μL に調合した。反応条件は、熱変性反応を 95°C: 10 秒、アニーリング~伸長反応を 60°C: 30 秒を 1 サイクルとした PCR を Nep1 と Necr を使用した場合は 40 サイクル、Nef1 を使用した場合は 45 サイクル行った。C_q 値は LightCycler®480 に付属する解析ソフトにより、second derivative maximum 法を使用して算出した。また、全てのプレートには既知の DNA 濃度 (94~550 ng mL⁻¹)に調節した各目的種の抽出産物を使用し、ノープリウス幼生試料と同様の条件で real-time PCR 分析を行うことで、プレート間の差異がないことを確かめた。

2.2.6. シークエンス解析による種同定

C_q 値を算出したノープリウス幼生を対象に COI 領域のユニバーサルプライマーを用いた PCR とシークエンス解析を行い、種を同定した。PCR はサーマルサイクラー (model 9700 Applied Biosystems Inc.)を使用し、プライマーはユニバーサルプライマー LCO1490 と HCO2198 を使用した (Folmer et al. 1994)。反応液は、PCR grade H_2O を 7.62 μL , 10 x PCR buffer を 1.5 μL , dNTPs (2.5 mM each)を 1.2 μL , LCO1490 と HCO2198 (5 μM) を 1.8 μL , Z-taq (TaKaRa)を 0.08 μL , DNA 試料を 1.0 μL の計 15 μL に調合した。反応条件は、熱変性反応を 94°C: 5 秒、アニーリングを 55°C: 5 秒、伸長反応を 72°C: 30 秒を 1 サイクルとし 35 サイクル行った。PCR 産物は、100 bp DNA ladder (Thermo scientific) と共に 2%に調整した TBE アガロースゲル (TaKaRa)で電気泳動した後、エチジウムブロマイド (EtBr)溶液で染色し、紫外線トランスイルミネーターによって増幅領域の確認をした。また、全ての PCR でノープリウス幼生の DNA 試料と共に、形態情報をもとに同定し

た各目的種雌成体の DNA 試料を陽性対象として解析し、増幅産物を比較した。各目的種雌成体の増幅産物には、明瞭なバンドが 700~800 bp 領域から認められたので、検証実験では、700~800 bp 領域に増幅産物が認められない個体を、目的種以外のノープリウス幼生として同定し、以降の解析から除外した。

700~800 bp 領域にバンドが認められ増幅産物を使用し、これらを ExoSap IT (USB Corp.)を用いて精製した後、ダイレクトシーケンス法によって COI 領域の塩基配列を決定した。精製後の試料は、BigDye terminator (Applied Biosystems Inc.)にて、前述の PCR と同じプライマー LCO1490 と HCO2198 を使用し蛍光物質を標識した。シーケンスは DNA シークエンサー (Model 3130 Applied Biosystems, Inc.)を使用し、シーケンスデータは Geneious v4.8.3 (Biomatters Ltd.) にてアッセンブルを行った。解析中に、シーケンスデータ内に、ミトコンドリア偽遺伝子 (numts)の存在による明瞭な 2 重のピークが認められる場合があった。これら 2 重ピークが認められた部位は、IUPAC コードに従い複合塩基として配列を決定した。アッセンブルを終えた全ての COI 塩基配列は、Geneious v4.8.3 (Biomatters Ltd.)にてタンパク質に転写し終止コドンの有無を確認した。形態情報を基に同定した目的種の雌成体も上記と同様の方法で COI 塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、GenBank に登録されている *Neocalanus* 属カイアシ類 3 種と、*N. flemingeri* L の COI 塩基配列 (GenBank accession numbers; AB526899, AB526881, AB526883, AB526894)と共に分子系統解析し、種同定を行った。アライメントは Clustal X 2.0 (Larkin et al. 2007)を用いて行い、分子系統解析には MEG v6.06 (Tamura et al. 2013)を使用し、近隣結合法 (Neighbor Joining)により無根系統樹を作成した、遺伝距離は同プログラムを用いて P-distance 法 (number of different sites)により求めた、また 500 回のブートストラップで系統樹の安定性を検定した。

2.3. 結果

2.3.1. *Neocalanus* 属 3 種特異的なプローブとプライマー、判別式の作成

2.3.1.1. *Neocalanus cristatus*

Neocalanus cristatus 用のプライマー、プローブセット (Necr)はプライマー: Necr_COI_F: 5'-AGT AAT ATT GCT CAT GCT GGC GGG -3', Necr_COI_R: 5'-ACC CGC AAG TTT CCA AGG CTT CTA-3'、プローブ; Necr_COI_P: 5'-6-FAM- TGC GGG TGT GAG GTC TAT TTT AGG TGC T -TAMRA-3'をそれぞれ作成した (Table 5)。

mPrimer3 を用いて Necr の候補領域を検索した結果、2 塩基以上の他種にはない目的種特異的な配列を含む以外、その他の条件を満たす領域が存在しなかった。そのため、Necr を作成する際、条件(2)を変更し、Forward または Reverse プライマーの 5 末端 4 塩基中に 1 塩基以上の他種にはない目的種特異的な配列を含む候補領域を選択した。また、条件(3)を満たすため、Reverse プライマーの候補領域の一塩基を C から G に変更した (Table 5)。プライマーの増幅領域は 123 bp であり、PCR 効率は 95%だった。

Table 5. *Neocalanus cristatus* specific primers and probe aligned with the corresponding sequence from other dominants copepods in the Oyashio region.

Taxon	Necr_COI_F	Necr_COI_P	Necr_COI_R
Necr	5' AGTAATATTGCTCATGCTGGCGGG 3'	5' TGC GGG TGT GAG GTC TAT TTT AGG TGC T 3'	5' TAGAAGCCTAGGAACTTGC GGGT 3'
<i>Neocalanus cristatus</i> ①
<i>Neocalanus cristatus</i> ②
<i>Neocalanus cristatus</i> ③
<i>Neocalanus flemingeri</i> S	..A.....C.....G..A..T	G..T.....A.....G..CC.....
<i>Neocalanus flemingeri</i> L ①	..A.....C.....G..A..Y	G..T.....A.....G..CG..C.....G.....A..A..
<i>Neocalanus flemingeri</i> L ②	..A.....C.....G..A..T	G..T.....A.....G..CG..C.....
<i>Neocalanus flemingeri</i> L ③	..A.....C.....G..A..T	R..T.....A.....G..CG..C.....R.....A..A..
<i>Neocalanus plumchrus</i> ①	..A..C.....C.....A..T	G.....T.....R.....A..	T.....C.....T.....G..T.....A..
<i>Neocalanus plumchrus</i> ②	..A..C.....C.....A..T	G.....T.....R.....A..	T.....C.....T.....G..T.....A..
<i>Neocalanus plumchrus</i> ②	..A..C.....Y.....A..T	G.....T.....R.....A..	T.....C.....T.....G..T.....A..
<i>Calanus pacificus</i>	..A.....C.....C.....	A..A..A..C..G.....C.....CT.....C.....A..A..
<i>Paracalanus parvus</i>	..G.....C.....A..A..T	A..A..G..T..A.....G.....GC..A.T.....T.....A..A..
<i>Pseudocalanus minutus</i>	..A.....C.....A..A..T	A..A.....T.....A.....C..A.T.....T.....T.....A..A..
<i>Pseudocalanus newmani</i>	..A.....C.....T..C	C..A..G..A..A.....T..C.T.....T..T.C.....A..A..
<i>Eucalanus bungii</i>	..A..G..G..C..C.....A..C.T	G..A.....A..A..C.....C.....C.T.G.....T..C.T.....A..
<i>Metridia asymmetrica</i>	..A..G..G..G.....C..A..A..T	G..A..G..C.T.C.C..A..C.....G.....G..C.....T.....G..C..T.....
<i>Metridia pacifica</i>	..G..G..G..G.....C..G..A..C	G..A..G..C.T.C.T..A..C.....G..AC.....G..T.....T..C.....
<i>Pleuromamma scutollata</i>	..G.....A.....G..A..	G..A..G..A..C.T.C..A.....G..AT..C..A.T.....A.....

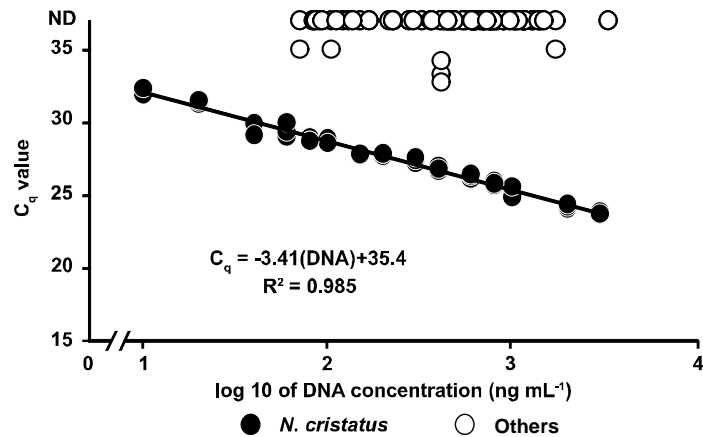


Fig.2. Standard curve of log 10 of DNA concentration (ng mL^{-1}) and C_q values from real-time PCR analysis using a primer pair and probe designed for *Neocalanus cristatus*. Black circles represent results of three replicates of dilution series of samples from morphologically identified C6 females of *N. cristatus*. Open circles represent results from C6 females of 14 other dominant copepod species in the Oyashio region (Table 3). ND represents the results of samples with no amplification.

Neocalanus 属 3 種を含む 16 種のカイアシ類を対象として特異性を検証した結果、5 個体全てにおいて、3 回の real-time PCR 解析で C_q 値が得られたのは *N. cristatus* のみだった (Table 3)。また、他種では *M. okhotensis* において、5 個体中 1 個体 (20%) のみが 3 回全てにおいて増幅が認められ、 C_q 値は平均: 33.4 ± 0.608 (S.D.) を示した。*N. cristatus* 5 個体の C_q 値は全て 24 以下であり、*M. okhotensis* より低い値を示した。これらの結果から Ncr セットは *N. cristatus* に対して高い特異性を持つことが判明した。

Neocalanus cristatus ノープリウス幼生同定用の判別式を作成した結果、下記の式を得た

$$C_q = -3.41(x) + 35.4 \quad (1)$$

x は ノープリウス幼生各個体から抽出した DNA の濃度 (ng mL^{-1}) を対数変換した値を示す。判別式の回帰計数 (r^2) は 0.985 を示し、段階希釈した DNA ($10 \sim 3,000 \text{ ng mL}^{-1}$) を用いた real-time PCR 解析では、 C_q 値の変動計数 (CV) は 0.09~1.36 の範囲を示した。(1) を用いて

特異性検証実験の結果から $|\Delta C_q|$ 値を算出した結果、*N. cristatus* は 5 個体全て 1.5 以下を示しているのに対して、*M. okhotensis* を含めた他種は 6 以上を示しており、 $|\Delta C_q|$ を用いて、*N. cristatus* と他種との判別が可能だと判明した (Fig. 2)。

Table 6. *Neocalanus flemingeri* small form specific primer and probe aligned with the corresponding sequence from dominant copepods in the Oyashio region.

Taxon	Nefl_COI_F	Nefl_COI_P	Nefl_COI_R
Nefl	5' TGC GGG AGG TTC TGT AGA CT 3'	5' TGAGATCTATTTTAGGGCC 3'	5' GAACCCCTCGGAACTTACGAG 3'
<i>Neocalanus flemingeri</i> S
<i>Neocalanus flemingeri</i> L ①Y.....G.....
<i>Neocalanus flemingeri</i> L ②G.....
<i>Neocalanus flemingeri</i> L ③G.....R.....R.....
<i>Neocalanus plumchrus</i> ①S.....T.....R.....A.....T.....T.....G.....T.....G.....
<i>Neocalanus plumchrus</i> ②G.....T.....G.....A.....T.....T.....G.....T.....G.....
<i>Neocalanus cristatus</i> ①C.....G.....G.....T.....R.....G.....T.....T.....A.....G.....G.....G.....
<i>Neocalanus cristatus</i> ②C.....G.....G.....T.....A.....G.....T.....T.....R.....G.....G.....G.....
<i>Neocalanus cristatus</i> ③C.....G.....G.....T.....G.....G.....T.....T.....G.....G.....G.....G.....
<i>Calanus pacificus</i>C.....G.....T.....A.....C.....G.....C.....T.....A.....C.....C.....
<i>Paracalanus parvus</i>A.....A.....A.....T.....A.....T.....A.....T.....A.....T.....A.....T.....
<i>Pseudocalanus minutus</i>A.....G.....A.....T.....T.....T.....T.....T.....C.....A.....T.....T.....
<i>Pseudocalanus newmani</i>T.....T.....C.....G.....A.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....T.....T.....
<i>Eucalanus bungii</i>C.....T.....C.....A.....G.....T.....A.....C.....C.....C.....G.....A.....T.....T.....C.....G.....
<i>Metridia asymmetrica</i>C.....A.....G.....CTCC.....A.....C.....G.....T.....G.....C.....T.....G.....
<i>Metridia pacifica</i>C.....G.....A.....C.....CTCT.....A.....C.....A.....G.....G.....T.....T.....C.....C.....G.....
<i>Pleuromamma scutullata</i>T.....G.....A.....G.....A.....T.....CTC.....A.....A.....T.....A.....T.....A.....G.....G.....

2.3.1.2. *Neocalanus flemingeri*

Neocalanus flemingeri S 用プライマー、プローブセット (Nefl) はプライマー: Nefl_COI_F: 5'-TGC GGG AGG TTC TGT AGA CT-3'、Nefl_COI_R: 5'-CTC GTA AGT TTC CGA GGG TTC-3'、プローブ: Nefl_COI_P: 5'-6-FAM-TGA GAT CTA TTT TAG GGG CC -TAMRA-3'をそれぞれ作成した (Table 6)。Nefl は、2 塩基以上の他種にはない *N. flemingeri* S に特異的な領域を含み、また、作成基準(1)、(3)、(4)を満たすプライマー、プローブセットである (Table 6)。プライマーの増幅領域は 102 bp であり、PCR 効率は 87% だった。

Neocalanus 属 3 種を含む 16 種のカイアシ類を対象として特異性を検証した結果、3 回の real-time PCR 解析で、全ての個体から C_q 値が算出できたのは、*N. flemingeri* S (5 個

体中 5 個体 [100%])と *N. flemingeri* L (4 個体中 4 個体 [100%])のみだった (Table 3)。他種の C_q 値は、DNA 濃度に関わらず 35 以上を示したのに対して、*N. flemingeri* S の C_q 値は 22.3~28.2 であり、他種と比べ 6 サイクル以上の差異が認められた。しかし、*N. flemingeri* L には低い C_q 値 (平均: 27.6 ± 0.03 [S.D.])を示す個体が出現しており、 C_q 値のみでは *N. flemingeri* S と *N. flemingeri* L の判別が困難であると判明した。

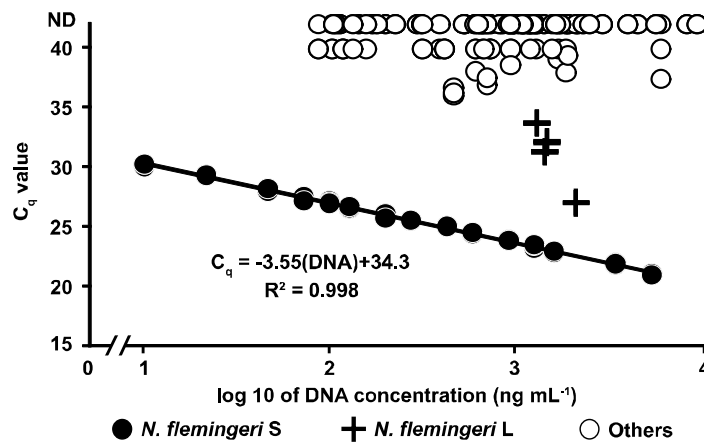


Fig.3. Standard curve of log 10 of DNA concentration (ng mL^{-1}) and C_q values from real-time PCR analysis using a primer pair and probe designed for *Neocalanus flemingeri* small form. Black circles represent results of three replicates of dilution series of samples from morphologically identified C6 females of *N. flemingeri* small form. Open circles represent results from C6 females of other 15 dominant copepods species, and cross represent result from C6 female of *N. flemingeri* large form in the Oyashio region (Table 3). ND represents the results of samples with no amplification.

Neocalanus flemingeri S の雌成体を使用し、以下の式を示す判別式を作成した。

$$C_q = -3.55(x) + 34.3 \quad (2)$$

x はノープリウス幼生各個体から抽出した DNA の濃度 (ng mL^{-1})を対数変換した値を示す。判別式の回帰計数 (r^2)は 0.998 を示し、段階希釈した DNA ($10 \sim 3,000 \text{ ng mL}^{-1}$)を用いた real-time PCR 解析では、 C_q 値の変動計数 (CV)は 0.03~0.64 を示した。(2)を用いて特異性検証実験の結果から $|\Delta C_q|$ 値を算出した。その結果、*N. flemingeri* S 4 個体では 1 以下、一個体のみ 3.37 を示したのに対して、他種の $|\Delta C_q|$ 値は全て 10 以下を示し、 $|\Delta C_q|$ を用

いて *N. flemingeri* S と他種の判別が可能だと分かった (Fig. 3)。 *Neocalanus flemingeri* L 4 個体は全て 4 以上の $|\Delta C_q|$ 値を示していた。この結果から、 $|\Delta C_q|$ 値を用いて *N. flemingeri* S と L の分類が可能だと判明した。

2.3.1.3. *Neocalanus plumchrus*

Neocalanus plumchrus 用のプライマー、プローブセット (Nepl) はプライマー; Nepl_COI_F: 5'-GGG CAG CAG ATA TGG CGT TTC-3'、Nepl_COI_R: 5'-GCG GGT ATA CGG TTC ATC CTG TT-3'、プローブ: Nepl_COI_P: 5'-6-FAM-CGA GAT CTT TAG TTG AAA GGG GAG CGG G-BHQ-3' をそれぞれ作成した (Table 7)。Nepl は、3 塩基以上の多種には無い目的種特異的な領域を含み、また、作成基準の(1)と(2)を満たすプライマー、プローブセットである (Table 7)。プライマーの増幅領域は 129 bp であり、PCR 効率は 86%だった。

Table 7. *Neocalanus plumchrus* specific primers and probe aligned with the corresponding sequence from other dominant copepods in the Oyashio region.

Taxon	Nepl_COI_F	Nepl_COI_P	Nepl_COI_R
Nepl	5' GGGCAGCAGATATGGCGTTTC 3'	5' CGAGATCTTTAGTTGAAAGGGGAGCGGG 3'	5' AACAGGATGAACCGTATACCCGC 3'
<i>Neocalanus plumchrus</i>
<i>Neocalanus cristatus</i> ①
<i>Neocalanus cristatus</i> ②
<i>Neocalanus flemingeri</i> S
<i>Neocalanus flemingeri</i> L ①
<i>Neocalanus flemingeri</i> L ②
<i>Calanus pacificus</i>
<i>Paracalanus parvus</i>
<i>Pseudocalanus minutus</i>
<i>Pseudocalanus newmani</i>
<i>Eucalanus bungii</i>
<i>Metridia asymmetrica</i>
<i>Metridia pacifica</i>
<i>Pleuromamma scutullata</i>

Neocalanus 属 3 種を含む 16 種のカイアシ類を対象として特異性を検証した結果、5 個体全てにおいて、3 回の real-time PCR 解析で C_q 値が得られたのは *N. plumchrus* のみだった (Table 3)。他種は、*N. cristatus* 4 個体を除き PCR 産物の増幅が起こらず C_q 値が算出されないか、 C_q 値 = 35 を示した。Nepl による real-time PCR では、PCR サイクル数を

40 に設定しているため、35 は PCR 終了直前の 35~40 サイクル間で PCR 産物の増幅が認められたこと示している。DNA 濃度 4460 ng mL^{-1} を示した *N. cristatus* が、他種では最も低い C_q 値 (平均: 33.5 ± 1.26 [S.D.]) を示した。検証に使用した *N. plumchrus* 試料の DNA 濃度は全て *N. cristatus* と比べ低いにも関わらず、5 個体全てが 9 サイクル以上低い C_q 値 (21.8~23.2) を示した。これらの結果から Nepl は *N. plumchrus* に対して高い特異性を持つことが判明した。

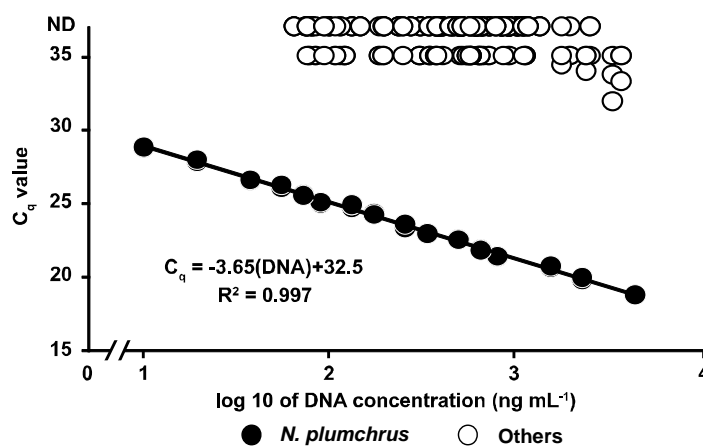


Fig.4. Standard curve of log 10 of DNA concentration (ng mL^{-1}) and C_q values from real-time PCR analysis using a primer pair and probe designed for *Neocalanus plumchrus*. Black circles represent results of three replicates of dilution series of samples from morphologically identified C6 females of *N. plumchrus*. Open circles represent results from C6 females of other 15 dominant copepods species in the Oyashio region (Table 3). ND represents the results of samples with no amplification.

Neocalanus plumchrus の雌成体を使用し、以下の式を示す判別式を作成した。

$$C_q = -3.65(x) + 32.5 \quad (3)$$

x はノープリウス幼生各個体から抽出した DNA の濃度 (ng mL^{-1}) を対数変換した値を示す。判別式の回帰計数 (r^2) は 0.997 を示し、段階希釈した DNA ($10 \sim 3,000 \text{ ng mL}^{-1}$) を用いた real-time PCR 解析では、 C_q 値の変動計数 (CV) は $0.04 \sim 0.48$ の範囲を示した。判別式 (3) を用いて、特異性検証実験の結果から $|\Delta C_q|$ 値を算出した結果、*N. plumchrus* 5 個体から得られた $|\Delta C_q|$ 値は全て 0.5 以下を示しているのに対して、親潮域に優占する他種は全て 9

以上を示した。この結果から、Nep1 を使用し算出した $|\Delta C_q|$ を用いて、*N. plumchrus* と他種の判別が可能だと分かった (Fig. 4)。

2.3.2. 種同定の結果と精度検証

2.3.2.1. *Neocalanus cristatus*

Necr を用いた real-time PCR 解析は、全ての成長段階を含むカラヌス目ノープリウス幼生計 1,841 個体を用いて行った。解析の結果、1,736 個体で PCR 産物の増幅が認められず、これらの個体を *N. cristatus* ノープリウス幼生以外と判別した。残った 105 個体を対象に判別式 (1) を用いて $|\Delta C_q|$ 値を算出した。Necr を用いて、各ノープリウス幼生から算出した $|\Delta C_q|$ 値から、階級幅を 1 としたヒストグラムを作成した結果、 $0 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 1$ と $1 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 2$ を示した個体数をもっとも多く、それぞれ 78、19 個体出現し、全体の 92% (105 個体中 97 個体) だった (Fig. 5)。

$0 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 1$ 、 $1 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 2$ をそれぞれ示したノープリウス幼生から各 10 個体無作為に選択した計 20 個体と、2 より大きい $|\Delta C_q|$ 値を示した 8 個体を対象に PCR とシーケンスを用いた種同定を行った。PCR の結果、2 より大きい $|\Delta C_q|$ 値を示した 5 個体で 700~800 bp 領域のバンドが認められず、これらのノープリウス幼生を他種と同定した。残りの PCR 産物でシーケンスを行い、303 bp の COI 塩基配列を決定した (Fig. 6; Assession number LC101972~LC101994)。系統解析では、A、B、C の 3 つのクレードが認められ、各クレード内の塩基配列は GenBank データベース内の配列と配列一致度 (identities) が 97% 以上を示し、それぞれのクレード内のノープリウス幼生を、*N. cristatus* と *N. plumchrus* と同定した (Fig. 6)。

PCR とシーケンスによる解析の結果を用いて、各階級における *N. cristatus* ノープリウス幼生の割合を算出したところ、 $0 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 1$ 、 $1 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 2$ を示した 20 個体全てが *N. cristatus* だった (Fig. 5)。この結果から、 $|\Delta C_q|$ 値 2 以下を示した 98 個体全てが

*N. cristatus*だと判断した。また、*N. cristatus* ノープリウス幼生は、 $2 < |\Delta C_q| \leq 3$ から、約 50% (4 個体中 2 個体)の割合で出現した (Fig. 5)。これらの結果から、Necr を用いて real-time PCR 解析を行い、 $|\Delta C_q|$ 値 2 以下を基準として同定を行った場合、*N. cristatus* ノープリウス幼生のみを約 99%の割合 (99 個体の *N. cristatus* ノープリウス幼生中 2 個体を他種と誤同定)で判別できると判明した。

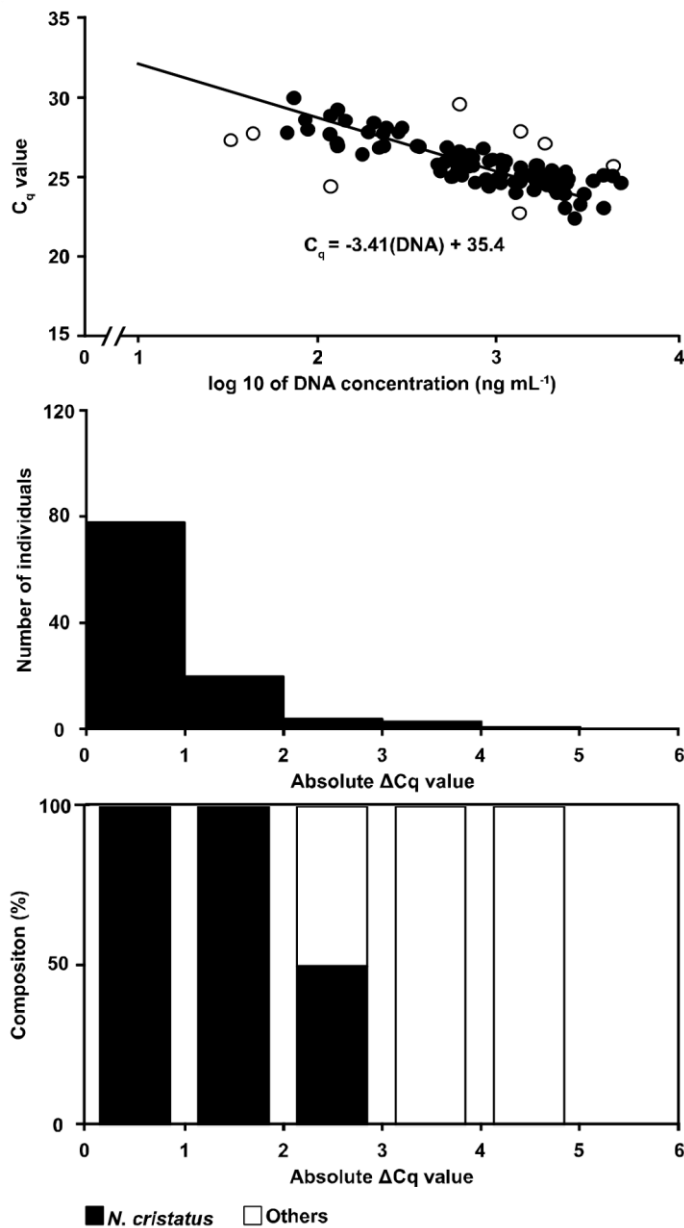


Fig.5. Standard curve for *Neocalanus cristatus* identification and the relationship between C_q values that measured with Necr and \log_{10} of DNA concentration (ng mL⁻¹) of calanoida nauplii from the Oyashio region (upper), the frequency distribution of $|\Delta C_q|$ (middle), and result of species identification with PCR and sequence analysis (lower). Nauplii that failed to amplify or with a $C_q = 35$ were excluded from these figures. Black and open circles represent nauplii with $|\Delta C_q| \leq 2$ and $2 < |\Delta C_q|$, respectively.

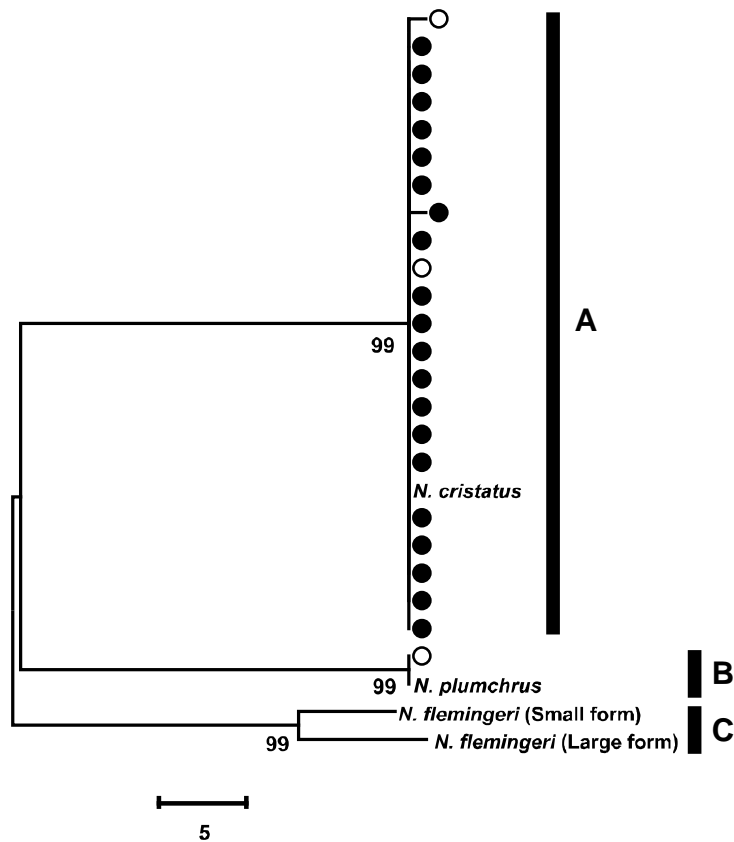


Fig.6. Unrooted neighbor-joining tree of COI (303 bp) sequences constructed based on the number of different sites from 20 randomly selected nauplii from results of the group with $|\Delta C_q| \leq 2$ (GenBank accession numbers; LC101972 - LC101991), 3 nauplii from the group with $|\Delta C_q| > 2$ (GenBank accession numbers; LC101992 - LC101994) in real-time PCR with Necr, and three *Neocalanus* species and one form from GenBank (GenBank accession numbers; AB526899, AB526881, AB526883 and AB526894), Black and open circles represent sequences from nauplii with $|\Delta C_q| \leq 2$ and $2 < |\Delta C_q|$, respectively. Numbers beside major internal branches indicate bootstrap values after 500 replications using the neighbor-joining method. The clades, which are discussed in the text, are labeled A, B and C.

2.3.2.2. *Neocalanus flemingeri* S

Nefl を用いた real-time PCR 解析は、全ての成長段階を含むカラヌス目ノープリウス幼生計 1,493 個体を用いて行った。解析の結果、702 個体で PCR 産物の増幅が認められず、541 個体で C_q 値が 35 以上を示したので、これら 1243 個体を *N. flemingeri* S ノープリウス幼生以外と判別した。残った 250 個体を対象に判別式 (2)を用いて $|\Delta C_q|$ 値を算出した。解析

の結果、 $0 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 1$ と $1 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 2$ を示した個体数をもっとも多く、それぞれ 97、54 個体出現し、全体の 60.4% (250 個体中 151 個体)を示した (Fig. 7)。 $2 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 3$ を示した個体は 15 個体であり、 $3 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 6$ を示した個体は、それぞれの階級で 10 個体以下に減少した。 $6 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 9$ では個体数が増加し、 $7 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 8$ を示した個体数は $1 < |\Delta C_q| \text{ 値} < 2$ に次いで高い値を示した。

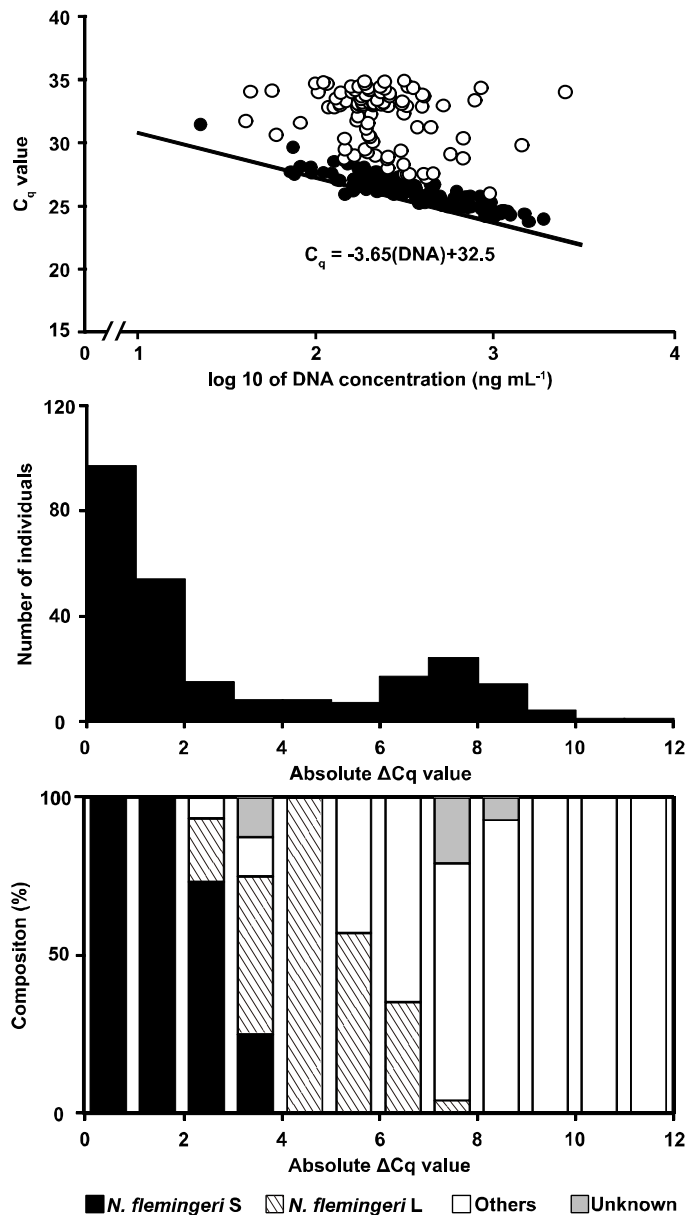


Fig.7. Standard curve for *Neocalanus flemingeri* small form identification and the relationship between C_q values that measured with Nef1 and log 10 of DNA concentration (ng mL⁻¹) of calanoida nauplii from the Oyashio region (upper), the frequency distribution of $|\Delta C_q|$ (middle), and result of species identification with PCR and sequence analysis (lower). Nauplii that failed to amplify or with a $35 < C_q$ were excluded from these figures. Black and open circles represent nauplii with $|\Delta C_q| \leq 2$ and $2 < |\Delta C_q|$, respectively.

$|\Delta C_q|$ 値 2 以下を示したノープリウス幼生から各 10 個体無作為に選択した計 20 個体と、2 より大きい $|\Delta C_q|$ 値を示した 99 個体を対象に PCR とシーケンスを用いた種同定を行った。なお、2 より大きい $|\Delta C_q|$ 値を示した 99 個体中に *Necr* を用いた real-time PCR で $|\Delta C_q|$ 値 2 以下を示した個体が 1 個体出現した。この個体は *N. cristatus* ノープリウス幼生と判断し、以降の解析から除外した。PCR の結果、2 より大きい $|\Delta C_q|$ 値を示した 18 個体で 700~800 bp 領域のバンドが認められず、これらのノープリウス幼生を他種と同定した。残りの PCR 産物でシーケンスを行い、 $|\Delta C_q|$ 値 2 以下を示した 20 個体全て (black circles in Fig. 8; Assession number LC101995~LC102014)、2 より大きい $|\Delta C_q|$ 値を示した 80 個体中 73 個体 (open circles in Fig. 8; assession number LC102015~LC102088) で 322 bp の COI 塩基配列を決定した。系統解析では、A, B, C, D, E, F, G の計 7 つのクレードが認められ、A, B, C, D, E, F 内のノープリウス幼生の COI 塩基配列は GenBank データベース内の配列との配列一致度 (identities) が 98% 以上だったので、それぞれのクレード内のノープリウス幼生は、*N. flemingeri* S、*N. flemingeri* L、*N. plumchrus*、*N. cristatus*、*P. newmani*、*M. pacifica* に同定した (Fig. 8)。クレード G のノープリウス幼生は、90% 以上の配列一致度を示すカイアシ類が BLAST データベース上に存在せず、配列未登録種だと考えられる。

PCR とシーケンスによる解析の結果を用いて、各階級における *N. flemingeri* S ノープリウス幼生の割合を算出したところ、 $|\Delta C_q|$ 値 2 以下を示した全ての 20 個体が *N. flemingeri* S だった (Fig. 7)。この結果から、 $|\Delta C_q|$ 値 2 以下を示した 151 個体全てが *N. flemingeri* S だと考えられる。*Neocalanus flemingeri* S ノープリウス幼生は、 $2 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 4$ から 13 個体出現し、それぞれの階級における割合は $2 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 3$ で約 67% (15 個体中 11 個体)、 $3 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 4$ で 25% (8 個体中 2 個体) を示した (Fig. 7)。*Neocalanus flemingeri* L は $|\Delta C_q|$ 値 2 以下からは出現せず、 $2 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 8$ の範囲から計 27 個体出現した。 $4 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 5$ では、出現した 8 個体全てが *N. flemingeri* L で

あり、 $5 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 8$ では、それぞれの階級における割合が $5 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 6$ で約 57% (7 個体中 4 個体)、 $6 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 7$ で約 35% (17 個体中 6 個体)、 $7 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 8$ で約 4% (24 個体中 1 個体)を示した (Fig. 7)。これらの結果から、Nefl を用いて real-time PCR 解析を行い、 $|\Delta C_q| \text{値} 2$ 以下を基準として同定を行った場合、*N. flemingeri* S ノープリウス幼生のみを約 92%の割合 (164 個体の *N. flemingeri* S ノープリウス幼生中 13 個体を他種と誤同定)で同定できると判明した。

Nefl を用いて、*N. flemingeri* S と L 両方を同定する場合、 $|\Delta C_q| \text{値} 2$ 以下を示した個体と、 $4 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 5$ を示した個体を *N. flemingeri* ノープリウス幼生と同定することで目的種のみを分類できる。しかし、 $2 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 4$ と 5 より大きな $|\Delta C_q| \text{値}$ を示した半数以上の *N. flemingeri* L ノープリウス幼生 (27 個体の *N. flemingeri* L ノープリウス幼生中 19 個体)を誤同定する。そのため、Nefl を用いて *N. flemingeri* L ノープリウス幼生を種同定するには、real-time PCR 分析に加えて、2 より大きな $|\Delta C_q| \text{値}$ を示したノープリウス幼生を対象に、シーケンスによる種同定を行う必要がある。

本解析では、2 より大きな $|\Delta C_q| \text{値}$ を示し、また PCR 解析の結果で 700~800 bp 領域のバンドが認められた 80 個体中 7 個体でシーケンス解析に失敗し、塩基配列を得られなかった。不明個体を *N. flemingeri* S とした場合、同定の割合が 92%から 88% (171 個体の *N. flemingeri* S ノープリウス幼生中 20 個体を他種と誤同定)に低下する。しかし、シーケンスに成功した *N. flemingeri* S ノープリウス幼生は全て $|\Delta C_q| \text{値} 4$ 以下から出現しており、 $3 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 4$ を示した 1 個体は *N. flemingeri* S である可能性が高く、一方、 $7 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 9$ を示した 6 個体は他種である可能性が高いと考えられる (Fig. 7)。

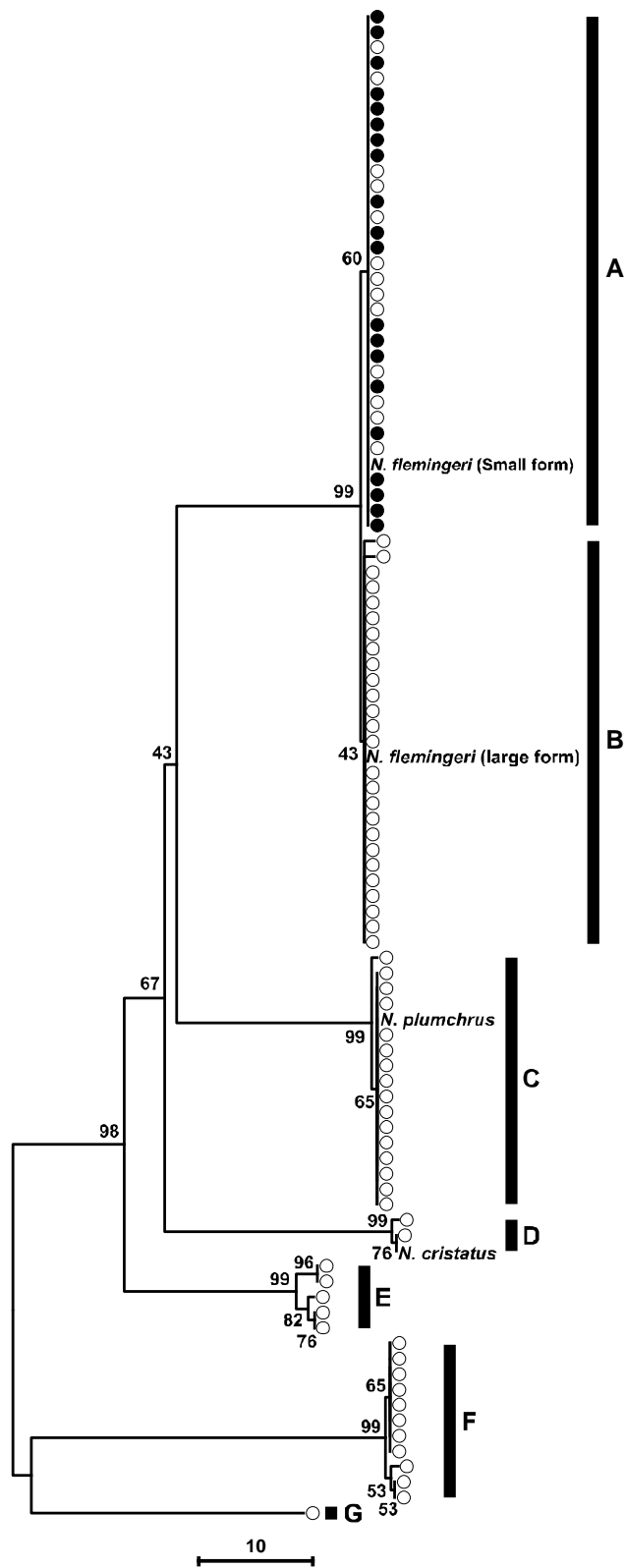


Fig.8. Unrooted neighbor-joining tree of COI (322 bp) sequences constructed based on the number of different sites from 20 randomly selected nauplii from results of the group with $|\Delta C_q| \leq 2$ (GenBank accession numbers; LC101995 - LC102014), 73 nauplii from the group with $|\Delta C_q| > 2$ (GenBank accession numbers; LC102015 - LC102088) in real-time PCR with Nefl, and three *Neocalanus* species and one form from GenBank (GenBank accession numbers; AB526899, AB526881, AB526883 and AB526894), Black and open circles represent sequences from nauplii with $|\Delta C_q| \leq 2$ and $2 < |\Delta C_q|$, respectively. Numbers beside major internal branches indicate bootstrap values after 500 replications using the neighbor-joining method. The clades, which are discussed in the text, are labeled A - G.

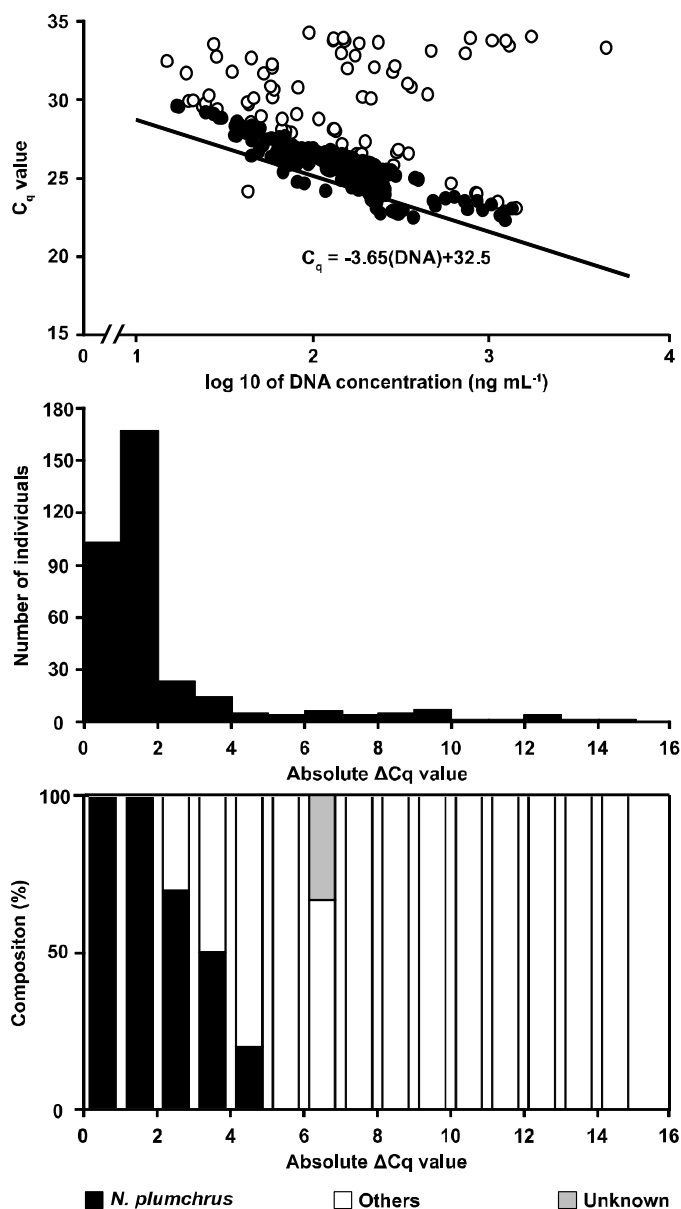


Fig.9. Standard curve for *Neocalanus plumchrus* identification and the relationship between C_q values that measured with Nepl and log 10 of DNA concentration (ng mL^{-1}) of calanoida nauplii from the Oyashio region (upper), the frequency distribution of $|\Delta C_q|$ (middle), and result of species identification with PCR and sequence analysis (lower). Nauplii that failed to amplify or with a $C_q = 35$ were excluded from these figures. Black and open circles represent nauplii with $|\Delta C_q| \leq 2$ and $2 < |\Delta C_q|$, respectively.

2.3.2.3. *Neocalanus plumchrus*

Nepl を用いた real-time PCR 解析は、全ての成長段階を含むカラヌス目ノープリウス幼生計 2,655 個体を用いて行った。解析の結果、1,883 個体で PCR 産物の増幅が認められず、426 個体で C_q 値が 35 を示したので、これら計 2,309 個体を *N. plumchrus* ノープリウス幼生以外と判別した。残った 346 個体を対象に判別式(3)を用いて $|\Delta C_q|$ 値を算出した。解析の結果、 $0 < |\Delta C_q| \leq 1$ と $1 < |\Delta C_q| \leq 2$ を示した個体数がもっとも多く、それぞれ 103, 167 個体出現し、全体の 78% (346 個体中 270 個体)が $|\Delta C_q|$ 値 2 以下を示した (Fig. 9)。

次いで個体数が多かったのは $2 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 3$ を示した個体であり、23 個体出現した。 $3 < |\Delta C_q| \text{ 値} \leq 4$ を示した個体は 14 個体出現し、4 より大きい $|\Delta C_q| \text{ 値}$ を示した個体は、10 個体以下だった。

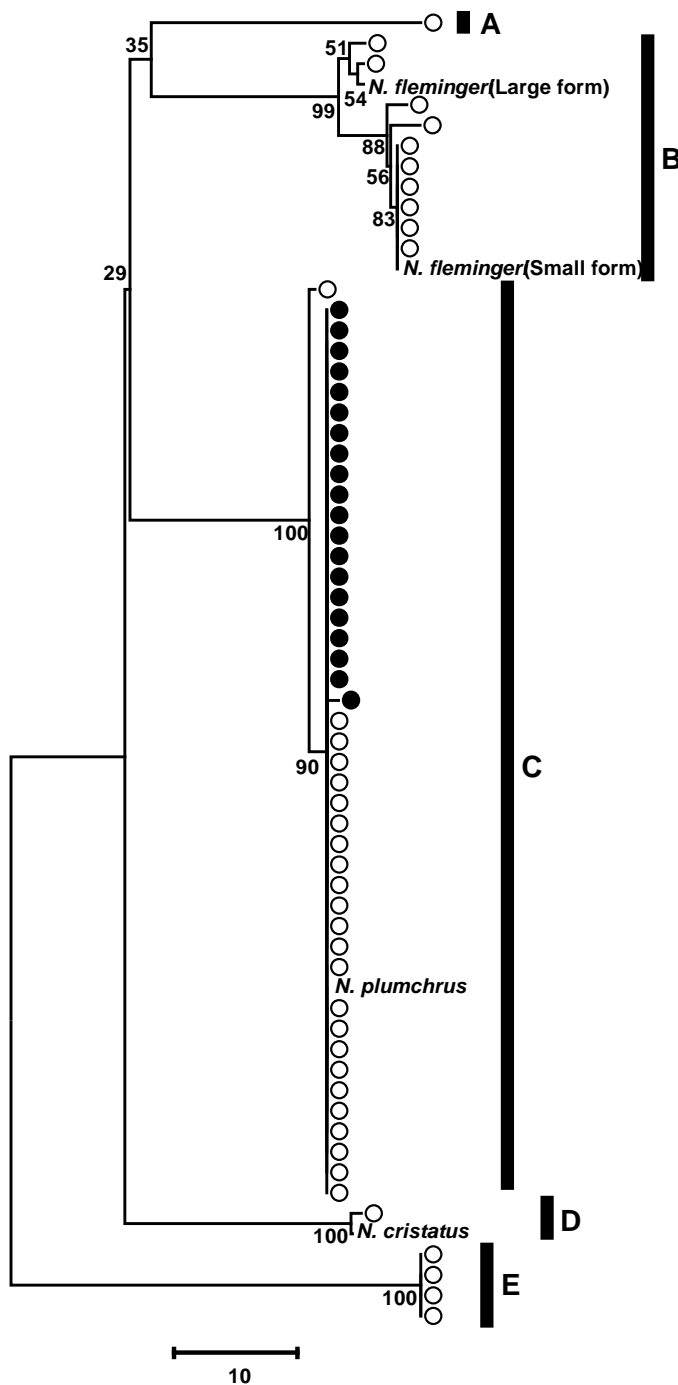


Fig.10. Unrooted neighbor-joining tree of COI (269 bp) sequences constructed based on the number of different sites from 20 randomly selected nauplii from results of the group with $|\Delta C_q| \leq 2$ (GenBank accession numbers; LC005540 - LC005559), 40 nauplii from the group with $|\Delta C_q| > 2$ (GenBank accession numbers; LC005560 - LC005585 and LC036331 - LC036344) in real-time PCR with Nepl, and three *Neocalanus* species and one form from GenBank (GenBank accession numbers; AB526899, AB526881, AB526883 and AB526894), Black and open circles represent sequences from nauplii with $|\Delta C_q| \leq 2$ and $2 < |\Delta C_q|$, respectively. Numbers beside major internal branches indicate bootstrap values after 500 replications using the neighbor-joining method. The clades, which are discussed in the text, are labeled A - E.

$0 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 1$ 、 $1 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 2$ をそれぞれ示したノープリウス幼生から各 10 個体無作為に選択した計 20 個体と、2 より大きい $|\Delta C_q| \text{値}$ を示した 76 個体を対象に PCR とシーケンスを用いた種同定を行った。PCR の結果、2 より大きい $|\Delta C_q| \text{値}$ を示した 34 個体で 700~800 bp 領域のバンドが認められず、これらのノープリウス幼生を他種と同定した。残りの PCR 産物でシーケンスを行った結果、 $|\Delta C_q| \text{値} 2$ 以下を示した 20 個体全て (black circles in Fig. 10; accession numbers LC005540~LC005559)、2 より大きい $|\Delta C_q| \text{値}$ を示した 40 個体 (open circles in Fig. 10; accession numbers LC005560~LC005585、LC036331~LC036344) で 269 bp の COI 塩基配列を決定した。系統解析では、A, B, C, D, E の計 5 つのクレードが認められ、各クレードにおけるノープリウス幼生の COI 塩基配列は GenBank データベース内の配列との配列一致度(identities)が 99% 以上だったので、それぞれのクレード内の種を、*Pseudocalanus minutus*, *N. flemingeri* (S and L), *N. plumchrus*, *N. cristatus*, *Metridia pacifica* に同定した (Fig. 10)。

PCR とシーケンスによる解析の結果を用いて、 $|\Delta C_q| \text{値}$ の各階級における、*N. plumchrus* ノープリウス幼生の割合を算出したところ、 $|\Delta C_q| \text{値} 2$ 以下を示した 20 個体が全て *N. plumchrus* だと判明した (Fig. 10)。この結果から、 $|\Delta C_q| \text{値} 2$ 以下を示した 270 個体全てが *N. plumchrus* だと考えられる (Fig. 9)。また、 $2 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 3$ を示した 23 個体中、約 70% (16 個体) が *N. plumchrus* だった。*Neocalanus plumchrus* は $3 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 4$ と $4 < |\Delta C_q| \text{値} \leq 5$ から、それぞれ 50% (14 個体中 7 個体)、20% (5 個体中 1 個体) の割合で出現し、5 より大きな $|\Delta C_q| \text{値}$ を示した個体からは出現しなかった (Fig. 9)。この結果から、Nepl を用いて real-time PCR 解析を行い、 $|\Delta C_q| \text{値} 2$ 以下を基準として同定を行った場合、*N. plumchrus* ノープリウス幼生のみを約 92% の割合 (294 個体の *N. plumchrus* ノープリウス幼生中 24 個体を他種と誤同定) で判別できると判明した、しかし、約 8% (294 個体の *N. plumchrus* ノープリウス幼生中 24 個体) の *N. plumchrus* を他種として誤同定すると分かった。

本解析では、2 より大きな $|\Delta C_q|$ 値を示し、また PCR 解析の結果で 700~800 bp 領域のバンドが認められた 42 個体中 2 個体でシーケンス解析に失敗し、塩基配列を得られなかった。2 個体を *N. plumchrus* ノープリウス幼生とした場合、2 個体を含めない場合と比べて誤同定の割合が 92% から 91% (296 個体の *N. plumchrus* ノープリウス幼生中 26 個体を他種と誤同定) に低下する。しかし、シーケンスに成功した *N. plumchrus* ノープリウス幼生は全て $|\Delta C_q|$ 値 5 以下を示しているのに対して、2 個体は $6 < |\Delta C_q| \leq 7$ を示しており、2 個体が *N. plumchrus* ノープリウス幼生である可能性は低いと考えられる (Fig. 9)。

2.4. 考察

本章では、北太平洋亜寒帯域に分布する *Neocalanus* 属カイアシ類 *Neocalanus cristatus*、*N. flemingeri* S、*N. plumchrus* ノープリウス幼生を天然試料から種同定する real-time PCR を用いた同定手法開発に成功した。本研究手法は、real-time PCR 解析に先駆け、顕微鏡下でノープリウス幼生を成長段階別に分類し、各個体から DNA を抽出する。3 種専用のプライマー、プローブセットを用いて、抽出産物の real-time PCR 解析を行う。また、real-time PCR の分析結果である C_q 値は、抽出産物の DNA 濃度の違いによって値が変化することから、判別式を用いて各ノープリウス幼生から $|\Delta C_q|$ 値を算出し、種同定の指標とした。天然試料を用いた検証実験の結果、 $|\Delta C_q|$ 値 2 以下を示したノープリウス幼生を目的種として同定することで、試料中に含まれる、約 98% の *N. cristatus* ノープリウス幼生、約 88~92% の *N. flemingeri* S ノープリウス幼生、約 91~92% の *N. plumchrus* ノープリウス幼生のみを同定できると判明した。

本研究手法は、real-time PCR を用いることによって、多試料解析に適した簡便な種同定を、個体ごとに異なる DNA 濃度に影響を受けずに行うことが可能である。さらに、目的種のみを高い精度で同定することが可能であり、カイアシ類に限らず、他の形態情報も用いた種同定が困難な生物の生態学的な研究に使用できる研究手法であると考えられる。

第3章 *Neocalanus* 属カイアシ類の初期生活史

3.1. 緒言

Neocalanus 属カイアシ類ノープリウス幼生の生態学的知見は、Saito and Tsuda (2000) と Yoshiki et al. (2008, 2011)らの飼育実験によって報告されている。Yoshiki et al. (2008, 2011)は、深層の圧力環境を飼育環境下で再現し、*Calanus* 属と *Neocalanus* 属の卵を飼育した。*Calanus sinicus* を 1 および 10 atm 環境下で飼育した結果、1 atm に比べて 10 atm の孵化成功率が低下し、正常に発達出来なかった奇形ノープリウス幼生の出現率が増加していた (Yoshiki et al. 2008)。一方、*Neocalanus* 属カイアシ類の卵では、1~100 atm の飼育環境下において、孵化成功率に顕著な差異は認められず、奇形ノープリウス幼生も出現しなかったことから、*Neocalanus* 属の卵は *Calanus* 属に比べ、深層の高圧環境下に適した特徴を持つと示唆した (Yoshiki et al. 2011)。また、*Neocalanus* 属や *Calanus* 属は、複数回に分けてばら撒き型の産卵を行うことが知られており、Saito and Tsuda (2000)は、*Neocalanus* 3 種の雌成体を飼育し、産卵様式を観察することで 3 種の産卵回数、産卵期間、バッチ産卵数が異なることを報告した。*Neocalanus cristatus* の産卵は、約 60~90 日間行われ、産卵間隔が 11~15 日であり、計 400 個の卵を生産する。個体の産卵期間、産卵間隔共に *N. cristatus* が 3 種の中では最長であり、少量の卵を長期間にわたり産卵していた。*Neocalanus plumchrus* の産卵は、約 60 日行われ、産卵間隔が約 5 日であり、計 800 個の卵を生産した。一方で、*N. flemingeri* の産卵期間は約 40 日間で、3 種の中では最も短期間だった。*Neocalanus flemingeri* の産卵間隔は *N. plumchrus* より長く 8~9 日間であり、産卵数は 3 種の中では最も多い 900 個の卵を産卵した。これらの結果から、*N. flemingeri* は、他の 2 種に比べ短期間に多数の卵を産卵する特徴が認められた。卵の直径は *N. cristatus* が最も大きく直径 370 μm を示し、*N. plumchrus* と *N. flemingeri* の卵は約 150 μm だった。*Calanus* 属の卵径は 200 μm 以下であり (Conover 1967; McLaren et al. 1988;

Swalethorp et al. 2011)、*N. cristatus* は *Calanus* 属に比べ大きな卵を産卵し、また、*Calanus* 属の 10 倍以上の炭素 ($5331 \pm 285 \text{ ng egg}^{-1}$)、窒素 ($510 \pm 44 \text{ ng egg}^{-1}$)を含有している (Saito and Tsuda 2000)。さらに、*N. cristatus* の卵は他の 2 種にはない、形態的な特徴も有しており、表面に円錐型の気泡状の突起物を備えていた。卵色は *N. cristatus*、*N. flemeingeri*、*N. plumchrus* で、それぞれ青紫、半透明、濃茶色を呈していた。産卵パターンや卵の特徴の違いから、3 種は異なる生存戦略を持つと考えられ、Saito and Tsuda (2000) は、*N. cristatus* は、卵とノープリウス幼生の被食リスクを、長期間に渡り産卵を行うことで分散させていると示唆している。

3 種の *Neocalanus* 属では *N. cristatus* のみ、生息海域でノープリウス幼生の出現期間や分布深度の調査が行われている。Kobari and Ikeda (1999)は、親潮域において 2 年間、継続的に動物プランクトン試料を採集し、*N. cristatus* の卵とノープリウス幼生の個体数密度 (ind. m^{-2})の推移を報告している。卵とノープリウス幼生は通年的に出現しており、雌成体と同じく、500 m 以深に分布していた。卵とノープリウス幼生の個体数密度は雌成体と同期的に変動しており、主に 10~12 月に最も高い値を示した。初期コペポダイト期は主に 250 m 以浅から出現しており、ノープリウス幼生は鉛直移動を行い 500 m 以浅で初期コペポダイト期に成長していると考えられる。しかし、Kobari and Ikeda (1999)は成長段階別にノープリウス幼生を分類していないため、各成長段階の個体数密度推移や、鉛直移動様式は未解明である。また、ノープリウス幼生期の知見は、コペポダイト期に比べ少ないため、親潮域に *N. cristatus* のノープリウス幼生と体サイズ、形態共に類似した別種が混在している可能性は否定できない。本研究では、Real-time PCR による分子生物学的な種同定を行うことで、より正確な *N. cristatus* ノープリウス幼生の個体数密度の推移や分布深度を明らかに出来ると考えられる。

Neocalanus flemeingeri と *N. plumchrus* ノープリウス幼生の生活史は、Saito and Tsuda (2000)による飼育実験や、コペポダイト期の生態学的な知見から、推定することが可

能である。しかし、実際にノープリウス幼生の出現期間や分布深度の調査を行った研究例は存在せず、推定結果の検証に必要な知見が不足している。*Neocalanus flemingeri* S ノープリウス幼生は、産卵中における雌成体の出現期間である 10 月から翌年の 3 月に、主な産卵深度である 250 m 以深から出現すると考えられる (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2001a)。初期コペポダイト期は 250 m 以浅から出現するため (Kobari and Ikeda 2001a)、ノープリウス幼生は産卵深度以浅に移動した後に、初期コペポダイト期に成長すると考えられる。また、産卵個体の個体数密度 (ind. m⁻³) が 1~2 月に増加しており、初期コペポダイト期は 3 月に個体数密度が最大値を示すことから、ノープリウス幼生の個体数密度もこれらの月で増加すると考えられる (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2001a)。オホーツク海、日本海、親潮域には 2 年 1 世代の生活史を持つ大型の *N. flemingeri* large form (*N. flemingeri* L) が分布しており (Miller and Terazaki 1989; Tsuda et al. 1999, 2015)、初期コペポダイト期が表層に出現するタイミングが small form に比べ約 1 カ月遅れると報告されている (Tsuda et al. 1999, 2015)。この結果から、large form ノープリウス幼生は、small form に比べ初期コペポダイトに成長するタイミングが遅いと考えられる。

Neocalanus plumchrus のノープリウス幼生は、雌成体の産卵期である 10 月から翌年の 5 月に 500 m 以深に分布し、成長しながら徐々に上層に移動すると考えられている。しかし、他の 2 種とは異なり、生活史パターンに説明が出来ない矛盾点が存在し、未解明の生態学的特徴が存在する可能性が示唆されている (Miller and Clemons 1988; Mackas et al. 1998, 2012; Tsuda et al. 1999)。親潮域、及び Stn. P を含むアラスカ循環域における *N. plumchrus* の産卵期は、10 月から少なくとも約 120 日間以上続くと考えられている (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2000b)。 *Neocalanus plumchrus* ノープリウス幼生の滞留時間は Saito and Tsuda (2000) によって約 40 日間と推定されている。しかし、初期コペポダイト期は 4~5 月から出現すると報告されており、産卵開始から 2

カ月以上経過したにも関わらず 12 月、1 月からは出現しない (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2000b)。また、C5 出現から C4 の消失まで約 70~90 日間と報告されており (Miller and Clemons 1988)、産卵期の長さに対してコペポダイト期の出現や成長のタイミングが不自然に同期的な点が示唆されている (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999)。*Neocalanus* 属カイアシ類は休眠卵を産卵しないことから、*N. plumchrus* にはノープリウス幼生期に C1 の表層出現期間を調節する仕組みが存在する可能性がある。*Neocalanus plumchrus* 生活史の矛盾点に対して、現在 2 つの仮説が提唱されている (Miller and Clemons 1988; Mackas et al. 1998, 2012; Tsuda et al. 1999)。仮説 1 は、秋季に孵化したノープリウス幼生は、翌年の冬季~春季に孵化したノープリウス幼生に比べ死亡率が高く、その結果、冬季~春季の個体群のみが生残してコペポダイト期へ成長している死亡率変動説である (Miller and Clemons 1988; Mackas et al. 1998)。仮説 2 は、ノープリウス幼生が成長を停滞させ、春季に同期的に成長するとした、ノープリウス幼生の成長停滞説である (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Mackas et al. 2012)。

本章では、親潮域で採集した *Neocalanus* 3 種のノープリウス幼生を、前章で確立した real-time PCR を用いた同定方法によって成長段階ごとに同定し、出現期間、分布深度を特定する。得られた結果を用いて、Kobari and Ikeda (1999)による *N. cristatus* ノープリウス幼生の報告や、推測された *N. flemingeri*、*N. plumchrus* のノープリウス幼生期における生活史を検証し、3 種の初期生活史を解明することを本章の目的とする。また、*N. flemingeri* S 分類用のプローブ、プライマーセット Nef1 は、*N. flemingeri* L に対しても高い特異性を示しており (Table 2)、real-time PCR とシーケンスによる解析によって *N. flemingeri* L の同定が可能である。本章では、*N. flemingeri* S に加えて large form の種同定も行い、初期生活史の解明を行う。さらに、*N. plumchrus* ノープリウス幼生の個体数密度や鉛直分布の推移から、生活史の矛盾点を解明する新たな知見が得られる可能性がある。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 試料採集、環境データ測定

解析には、第2章で使用した独立行政法人東北区水産研究所若鷹丸及び北海道区水産研究所北光丸に乗船し、2009年10月、2010年の1月、3月、4月、5月に西部北太平洋亜寒帯、親潮域の観測点 A4、または SF6 にて採集した動物プランクトン試料を使用した (Table 1)。また、採集と同時に各測点において、CTD (Seabird SBE-9)による水温と塩分の測定を行った。採水は、CTD システムに装着した 12L ニスキンボトルと採水バケツにて 12 層 (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 125, 150, 200 m)から行った。採水した試料海水 118 mL をガラス繊維濾紙 (Whatman GF/F)により、75 mmHG 以下に減圧して吸引濾過した。濾過に使用した濾紙は、直ちに 6 mL の *N, N*-dimethylformamide を用いて、 -20°C の暗所で 24 時間静置し、クロロフィル *a* 色素を抽出した (Suzuki and Ishimaru, 1990)。クロロフィル *a* 濃度 (mg m^{-3})は蛍光光度計 (Turner Designs Co.,10-AU)を使用し、Welschmeyer 法 (Welschmeyer 1994)を用いて測定した。

3.2.2. ノープリウス幼生、成体の分類方法

ノープリウス幼生の種同定には、第2章で確立した方法を用いた。採集層ごとに各成長段階に分類したノープリウス幼生から無作為に選択した 10~20 個体を対象に、プローブ、プライマーセット Necr、Nefl、Nepl を使用した real-time PCR 解析結果と対応する判別式 eq. (1)、(2)、(3)を用いて $|\Delta C_q|$ 値を算出し、 $|\Delta C_q|$ 値 2 以下を示したノープリウス幼生を目的種として同定した。また、Nefl を用いた real-time PCR 分析で、2 より大きい $|\Delta C_q|$ 値を示した全ての個体を対象に、PCR とシーケンスを用いた種同定を行い、*N. flemingeri* L ノープリウス幼生の同定を行った (Fig. 8)。

ノープリウス幼生とは別に、採集試料から *Neocalanus* 属 3 種の雌成体を実体顕微鏡下

で選別し、各成熟段階に分類、計数した。成熟段階の分類は、Miller and Clemons (1988) に従い、卵巣や卵管の状態を観察して行った、しかし、Miller and Clemons (1988)では試料をホルマリンで固定しているのに対して、本研究ではエタノールを使用しているため、一部の試料の卵巣や卵管の観察が困難だった。*Neocalanus* 属の雌成体には、体内に白色の内部組織が認められる個体と、内部組織は第一触角と遊泳脚に少量認められるのみで、前体部の内部組織が不明瞭で、外殻のみを持つ透明な個体が存在していた。透明個体は、Miller and Clemons (1988)の定義する産卵後の雌成体にも認められる特徴である。本研究では透明個体を産卵後 (Spent)、体内に白色の内部組織が認められる個体を Miller and Clemons (1988)の休眠中、発達中、産卵中を含む産卵を終える前の雌成体 (Pre-spent)として、それぞれ分類計数した。また、*N. flemingeri* は前体部長を測定し、4.2 mm 以下を示した雌成体を *N. flemingeri* S、4.5 mm 以上を示した雌成体を *N. flemingeri* Lとして、それぞれ分類、計数した。

3.3.3. 個体数密度、鉛直分布深度算出方法

ノープリウス幼生の各深度における水柱当たりの個体数密度 (ind. m⁻²)は、顕微鏡観察による各成長段階の分類結果 (カラヌス目ノープリウス幼生の個体数密度)と、各成長段階から無作為に選択した 10~20 個体の real-time PCR による同定結果 (目的種の割合)から算出した。各成長段階の分布深度中央値 (D50%)及び鉛直的な分布範囲 (D10%、D 25%、D 75%、D 90%)は、Pennak (1943)を用いて算出した。各成長段階における D50%の比較を行う際は、分散の均一性の検定として Bartlett 検定を行い、等分散とみなされた場合は一元配置分散分析 (one-way ANOVA)を、等分散とみなされなかった場合は Kruskal-Wallis の順位検定を行った。また、ANOVA または Kruskal-Wallis 検定の結果、有意差が認められた場合は、それぞれ、Tukey-Kramer 法、または Steel-Dwass 法による多重比較を行った。

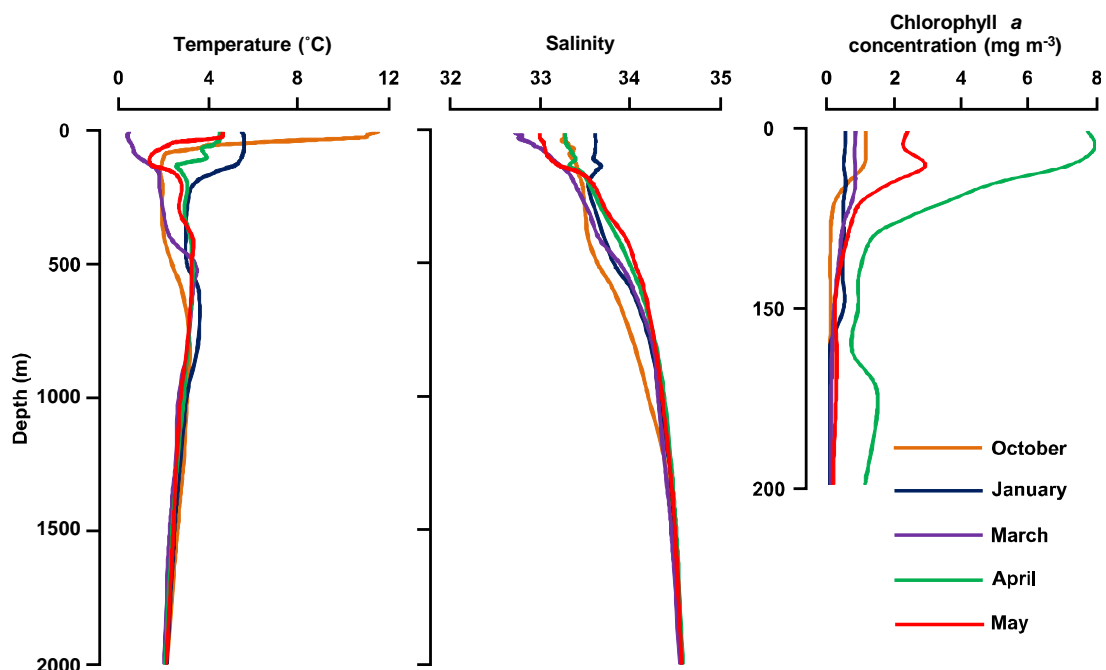


Fig.11. Seasonal changes in the vertical profiles of temperature, salinity, and chlorophyll a concentration in Oyashio region. Data were collected at Stn SF6 in April 2010, at Stn A4 in October 2009, January 2010, March 2010 and May 2010.

3.4. 結果

3.4.1. 環境データ

2010年1月における表面水温は 5.5°C を示し、表層混合層は150 mに達していた (Fig. 11)。2010年3月では、沿岸の親潮水が流入したと考えられ (Kusaka et al. 2009)、0~200 mで最も低い水温を示した ($<1^{\circ}\text{C}$)。4月、5月、10月では表面水温が上昇し、混合層深度が100 mから20 m以浅まで上昇した。表層の塩分は、1月が最も高く(33.6)、3月が最も低かった(32.7)。500 m以浅における塩分濃度は、全ての月で深度増加に伴い上昇した。500 m以深では水温、塩分共に、顕著な季節変化は認められなかった。

0~50 mにおけるクロロフィル a濃度は、1月が最も低く (0.44 mg m^{-3})、最も高かったのは4月だった ($2.3\sim 8 \text{ mg m}^{-3}$)。4月に次いでクロロフィル a濃度が高かったのは5月であり ($0.71\sim 2.9 \text{ mg m}^{-3}$)、10月では4、5月に比べクロロフィル a濃度は低かった ($0.083\sim 1.1$

mg m⁻³)。親潮域では、4~5月に春季の植物プランクトンブルームが起こると報告されており (Kasai et al. 1997)、本研究期間中でも4月から植物プランクトンのブルームが起こったと考えられる。

3.4.2. カラス目ノープリウス幼生の季節変化

カラス目ノープリウス幼生は、層別に採集した全ての試料から出現した (Fig. 12)。10月、1月、3月におけるノープリウス幼生の個体数密度には、顕著な変動は認められず、それぞれ 114,000 ind. m⁻²、156,000 ind. m⁻²、102,000 ind. m⁻² だった。4月は3月に比べ、ノープリウス幼生の個体数密度が4倍以上増加しており (459,000 ind. m⁻²)、特に0~50mで顕著な増加が認められた。5月は、ノープリウス幼生の個体数密度が最も少なく、39,900 ind. m⁻²を示した。

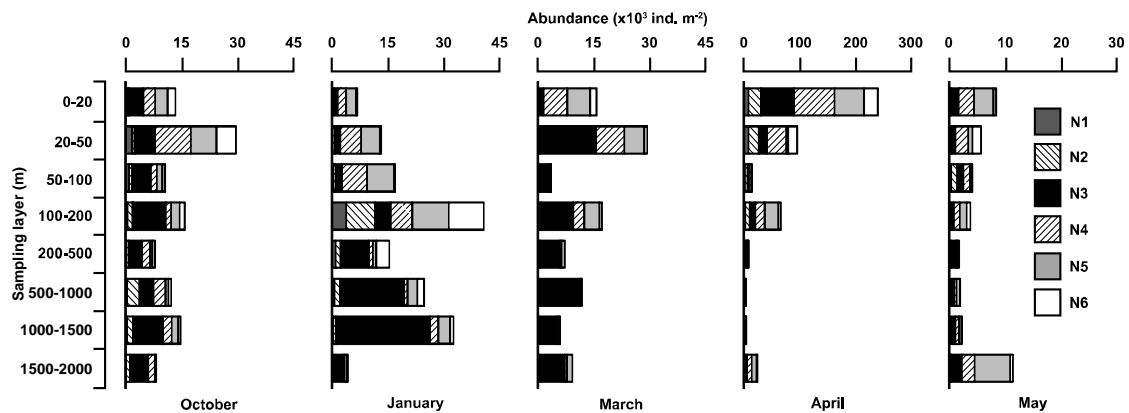


Fig.12. Vertical distribution of developmental stages of calanoid nauplii in Oyashio region from October 2009 to May 2010.

3.4.3. *Neocalanus* 属 3 種の雌成体とノープリウス幼生の季節変化と鉛直分布

3.4.3.1. *Neocalanus cristatus*

雌成体とノープリウス幼生の季節変化

雌成体は採集期間 (10月から翌年の5月)を通じて、pre-spent と spent が出現した (Fig. 13)。10月の pre-spent は 200 ind. m⁻²を示し、採集期間中最も高い値を示した。Spent の

個体数密度は 10 月では 16.5 ind. m⁻²を示し、pre-spent の 1/10 以下だった。1 月と 3 月では、Pre-spent の個体数が 10 月の約半分以下まで減少したのに対して、spent は増加しており 3 月に最大値 (80.5 ind. m⁻²)を示した。3 月以降は pre-spent と spent とともに大きく減少した。

Neocalanus cristatus のノープリウス幼生は採集期間 (10 月から翌年の 5 月)を通じて出現しており、10 月の個体数密度が最も高く、1 月以降は大きく減少していた (Fig. 13)。N1~3 は、10 月の個体数密度が最も高く、それぞれ N1: 80、N2: 1700、N3: 7500 ind. m⁻²を示し、1 月は出現しなかった (Figs. 13, 14)。3 月以降に出現した N2 と N3 は、10 月に比べ 1/10 以下の低い個体数密度を示した。N4 は採集期間を通じて出現し、10 月に個体数密度が最大値を示し(2000 ind. m⁻²)、3 月以降から 1/5 に減少していた。N5、N6 は 10 月から 1 月に大きく増加し、1 月に最大値を示した後 (N5: 2800、N6: 3600 ind. m⁻²)、3 月以降は 1/5 以下に減少した。各月に出現した後期ノープリウス幼生の比率は 1 月と 4 月以降に高く (Fig. 14)、個体数密度の変動 (Fig. 13)を合わせて考えると、同期群の産卵ピークは 10 月より前にあり、1~2 月には初期コペポダイト幼生に成長したと考えられる。

雌成体とノープリウス幼生の鉛直分布

採集期間を通じて、*N. cristatus* の雌成体とノープリウス幼生は 200 m 以深から出現した (Figs. 15, 16)。*N. cristatus* の雌成体は、5 月を除き、全て 500 m 以深から出現した。N1 は 10 月の 1000~1500 m からのみ出現した。N2~6 は主に 500 m 以深から出現し、個体数密度のピークは 10~3 月においては 500~1000m、4~5 月は 1000~1500m にあった。また、一部の N4~6 は 200~500 m からも出現した。

Pre-spent と N1 は、ほぼ同じ水深に分布中心を示し、N4 を除き N2 以降の成長段階はそれより浅い分布中心を示した (Figs. 16)。N2~6 の D50%を比較した結果、有意な差異が認められ (one-way ANOVA; $df=4$; $F=3.25$, $p=0.047$)、N6 は N4 より有意に浅い深度に

分布していることが判明した (Tukey-Kramer test; $p = 0.0453$)。N4 は他の成長段階と比べると深い深度に分布していたが、これは3月の1500~2000 m から出現した非同期的な産卵を行った個体群の分布深度が影響していると考えられ、3月を除き N4 は 200~1500 m から出現した (Fig. 15)。

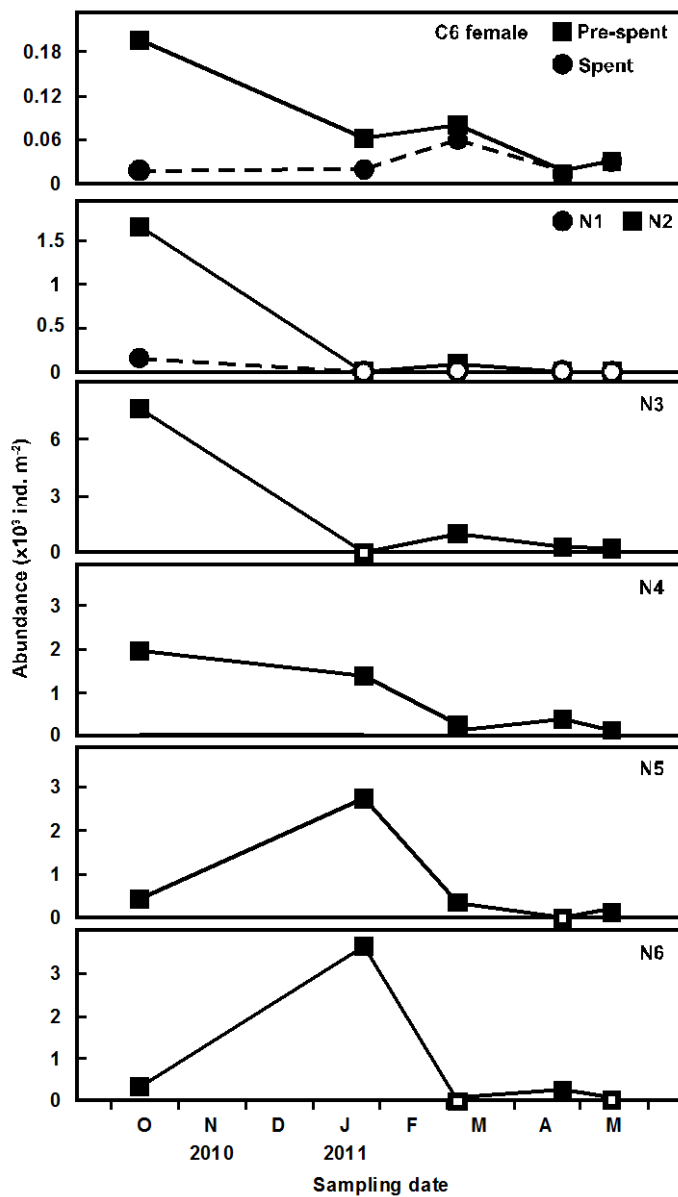


Fig.13. Seasonal changes in the standing stock of *Neocalanus cristatus* C6 females and each developmental stage of nauplii in the Oyashio region from October 2009 to May 2010. Black marks represent occurrence, open marks represent no occurrence.

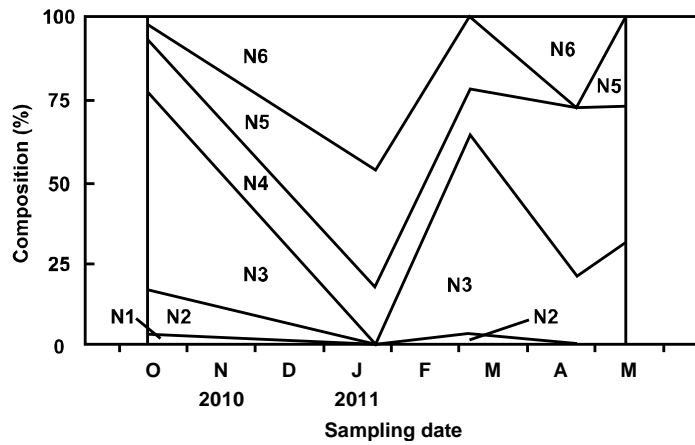


Fig.14. Stage composition of *Neocalanus cristatus* nauplii in the Oyashio region from October 2009 to May 2010.

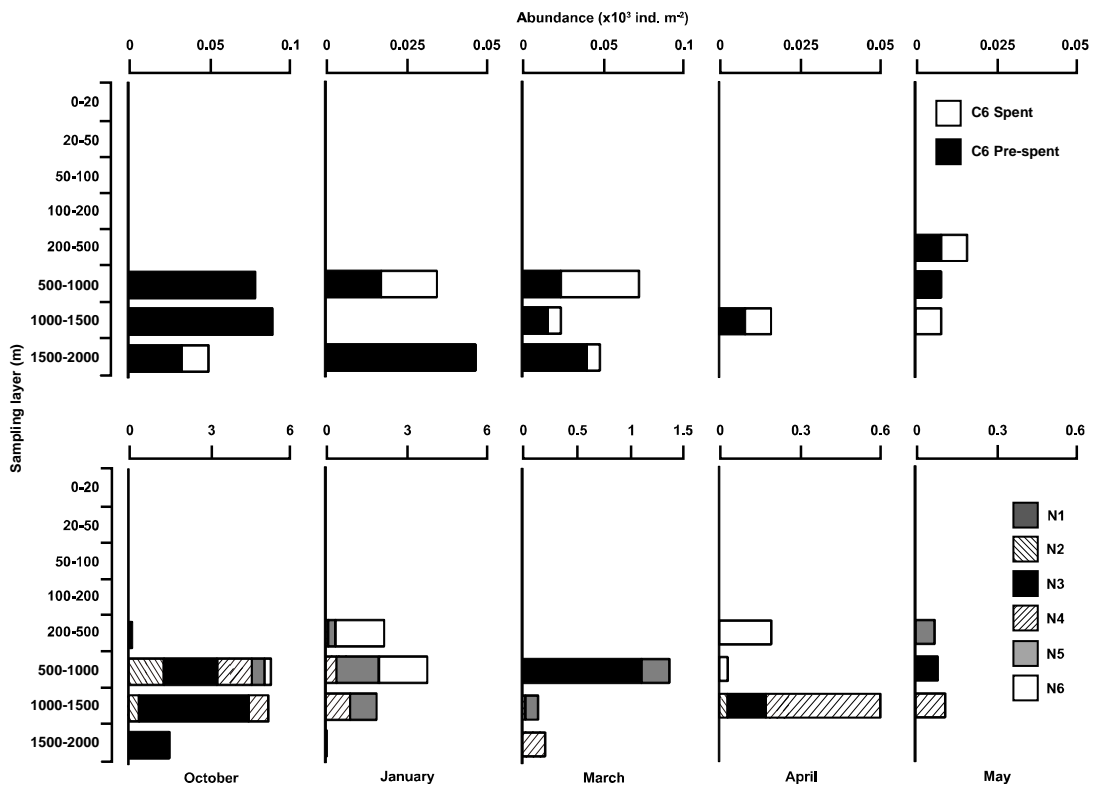


Fig.15. Vertical distribution of *Neocalanus cristatus* C6 females (top) and developmental stages of nauplii (Bottom) in the Oyashio region from October 2009 to May 2010.

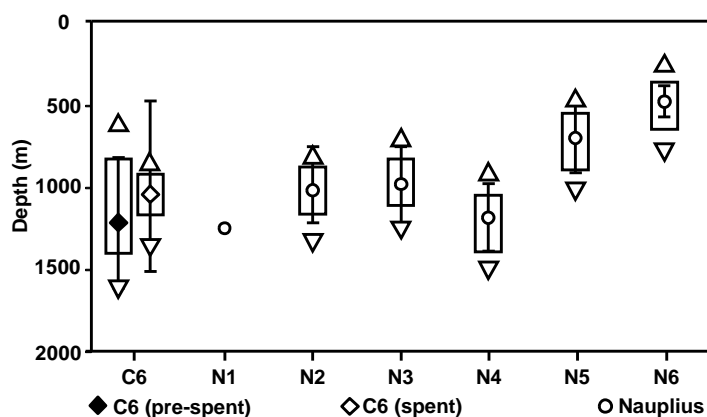


Fig.16. Vertical distribution of *Neocalanus cristatus* C6 females and developmental stages of nauplii from October 2009 to May 2010 in the Oyashio region. Circles represent average depth of D50%; error bars = SD. Upper and lower triangles represent range of distribution between average depth of D10% and D90%, respectively. Boxes show average depth ranges containing 50% of C6 female or nauplii populations, upper and lower margins of the boxes indicate average depths of D25% and D75%, respectively.

3.4.3.2. *Neocalanus flemingeri*

Neocalanus flemingeri small form: 雌成体とノープリウス幼生の季節変化

Neocalanus flemingeri S の雌成体は 10 月から翌年の 4 月まで出現した。Pre-spent は 10 月から翌年の 3 月に出現し、個体数密度は 10 月が最も高く (849 ind. m⁻²) 徐々に減少していた (Fig. 17)。一方で spent は 10 月から翌年の 4 月に出現し、3 月に最も個体数密度が高く (344 ind. m⁻²)、pre-spent の 2 倍以上を示した。

Neocalanus flemingeri S のノープリウス幼生は、全ての成長段階が 10 月から翌年の 3 月まで出現し、4 月からは出現しなかった (Figs. 17、18)。N1 と N2 の個体数密度は、1 月に最も高く 5,210 ind. m⁻² を示し、3 月には 260 ind. m⁻² に減少した。N3 の個体数密度は 10 月に最も高く、10 月に出現した *N. flemingeri* S ノープリウス幼生個体の 71% を占めており、1~3 月には減少していた。N4~6 の後期ノープリウス幼生は、10 月に最も少なく 10 月に出現した *N. flemingeri* S ノープリウス幼生個体の 14.1% を示したのに対して、1 月と 3 月では増加し、3 月では *N. flemingeri* S ノープリウス幼生個体の 69.9% を示した。

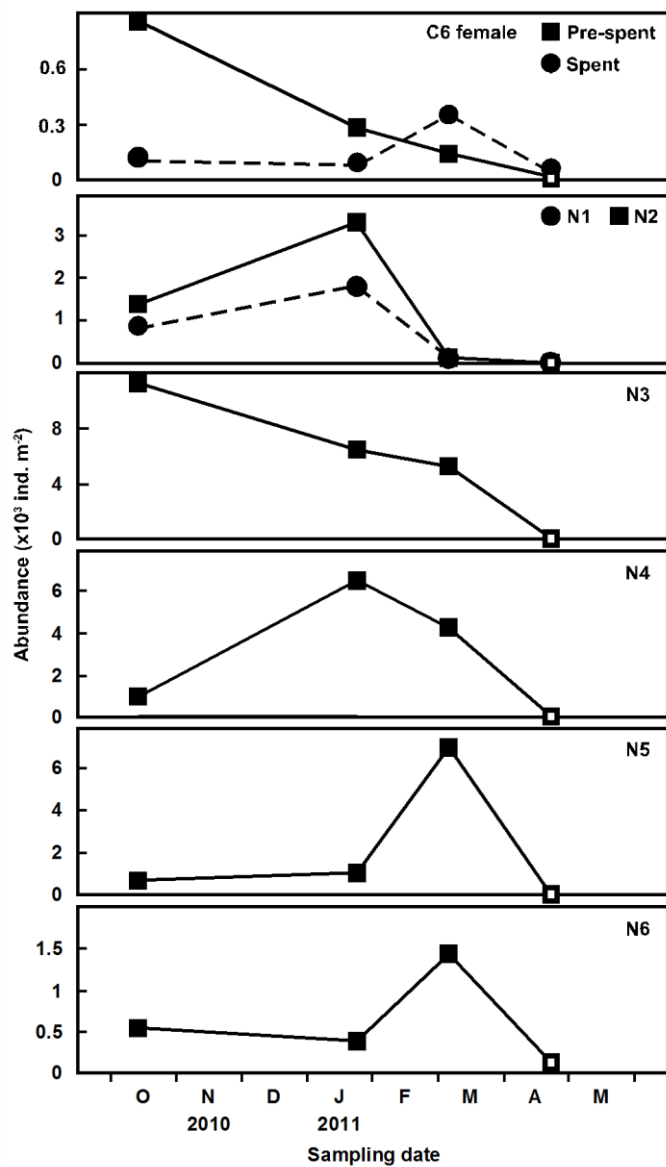


Fig.17. Seasonal changes in the standing stock of *Neocalanus flemingeri* small form C6 females and each developmental stage of nauplii in the Oyashio region from October 2009 to May 2010. Black marks represent occurrence, open marks represent no occurrence.

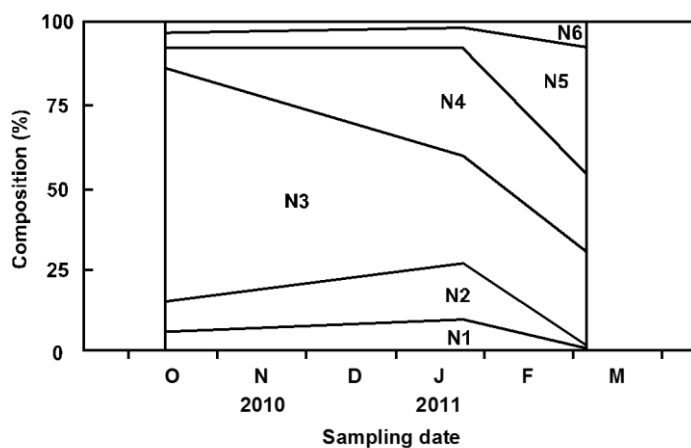


Fig.18. Stage composition of *Neocalanus flemingeri* small form nauplii in the Oyashio region from October 2009 to May 2010. No nauplius occur in May.

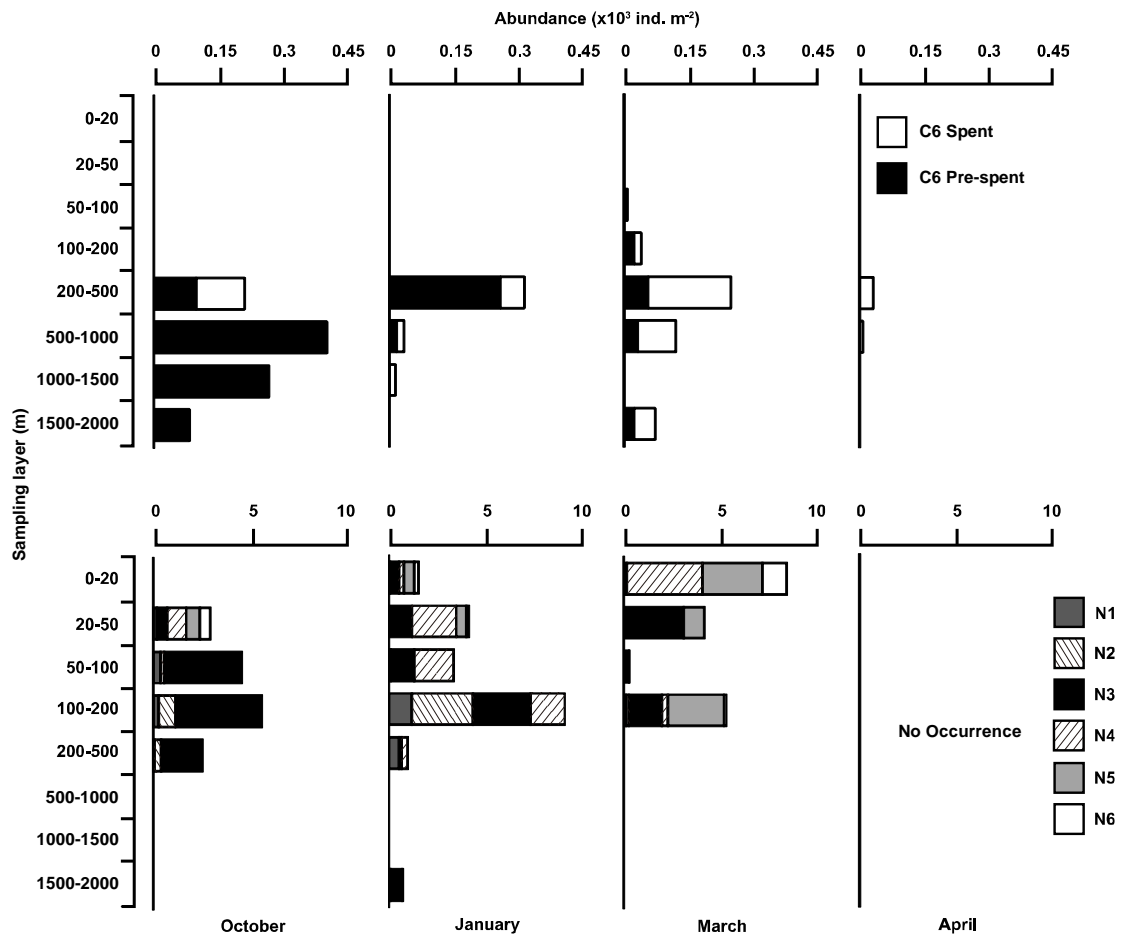


Fig.19. Vertical distribution of *Neocalanus flemingeri* small form C6 females (top) and developmental stages of nauplii (Bottom) in the Oyashio region from October 2009 to April 2010.

Neocalanus flemingeri small form: 雌成体とノープリウス幼生の鉛直分布

成体雌は主に 200 m 以深から出現した (Fig. 19)。10 月における pre-spent のみ、他の月に比べ分布深度が深く、1 月と 3 月の D50%がそれぞれ 359 と 350 m だったのに対して、10 月は 907 m であり、80%以上の pre-spent が 500 m 以深に分布していた (Fig. 19)。

ノープリウス幼生は主に 200 m 以浅から出現した (Figs. 19, 20)。N1~6 の D50%を比較した結果、有意な差異が認められ (one-way ANOVA; $df=5$; $F=12.5$, $p<0.001$)、N1、N2 は、後期ノープリウス幼生 (N4~6)に比べ有意に深い深度に分布していた (Tukey-Kramer test, $p<0.02$)。N1、N2 の平均 D50%はそれぞれ、133 m、154 m だった

が、pre-spent は 537 m を示し、初期ノープリウス幼生は雌成体より上層に分布していた。N3 の平均 D50% は N1、N2 に次いで深く、92.7 m だった、また、N3 の平均 D25%~D75% は 55~160 m を示し、他の成長段階と比べ、鉛直的な出現範囲が最も広がった (Fig. 20)。

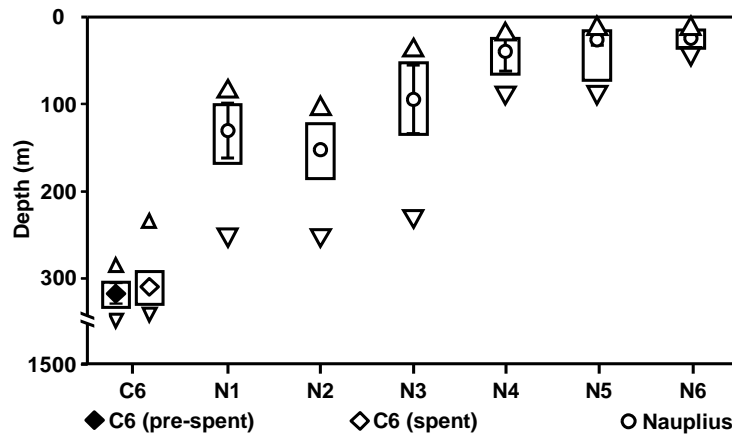


Fig.20. Vertical distribution of *Neocalanus flemingeri* small form C6 females and developmental stages of nauplii from October 2009 to May 2010 in the Oyashio region. Circles represent average depth of D50%; error bars = SD. Upper and lower triangles represent range of distribution between average depth of D10% and D90%, respectively. Boxes show average depth ranges containing 50% of C6 female or nauplii populations, upper and lower margins of the boxes indicate average depths of D25% and D75%, respectively.

Neocalanus flemingeri large form: 雌成体とノープリウス幼生の季節変化と鉛直分布

Neocalanus flemingeri L の雌成体は、10月から翌年の3月にかけて200~500 m から出現し、Spentは3月から出現した (Figs. 21、22)。全ての月で large form の雌成体個体数密度は small form に比べ少なく、large form の個体数密度が最も多かった1月 (36.8 ind. m⁻²)においても、small form の約10%だった (Figs. 17、21)。

Large form のノープリウス幼生は10月には出現せず、1~4月に出現した (Fig. 21)。N2は1月と3月に出現した。N3は1~4月に出現し、1月と3月では、それぞれの月で出現した *N. flemingeri* L ノープリウス幼生個体の74%と88%を示した。N4~6のノープリウ

ス幼生は、3月と4月に出現し、4月にはN5とN6が優占し *N. flemingeri* L ノープリウス幼生個体の93%を示した。ノープリウス幼生は主に500m以浅に分布し、N2は主に200~500mから出現した (Fig. 22)。3月におけるN3が鉛直的に最も広い範囲から出現しており、主に50~500mに分布していた。

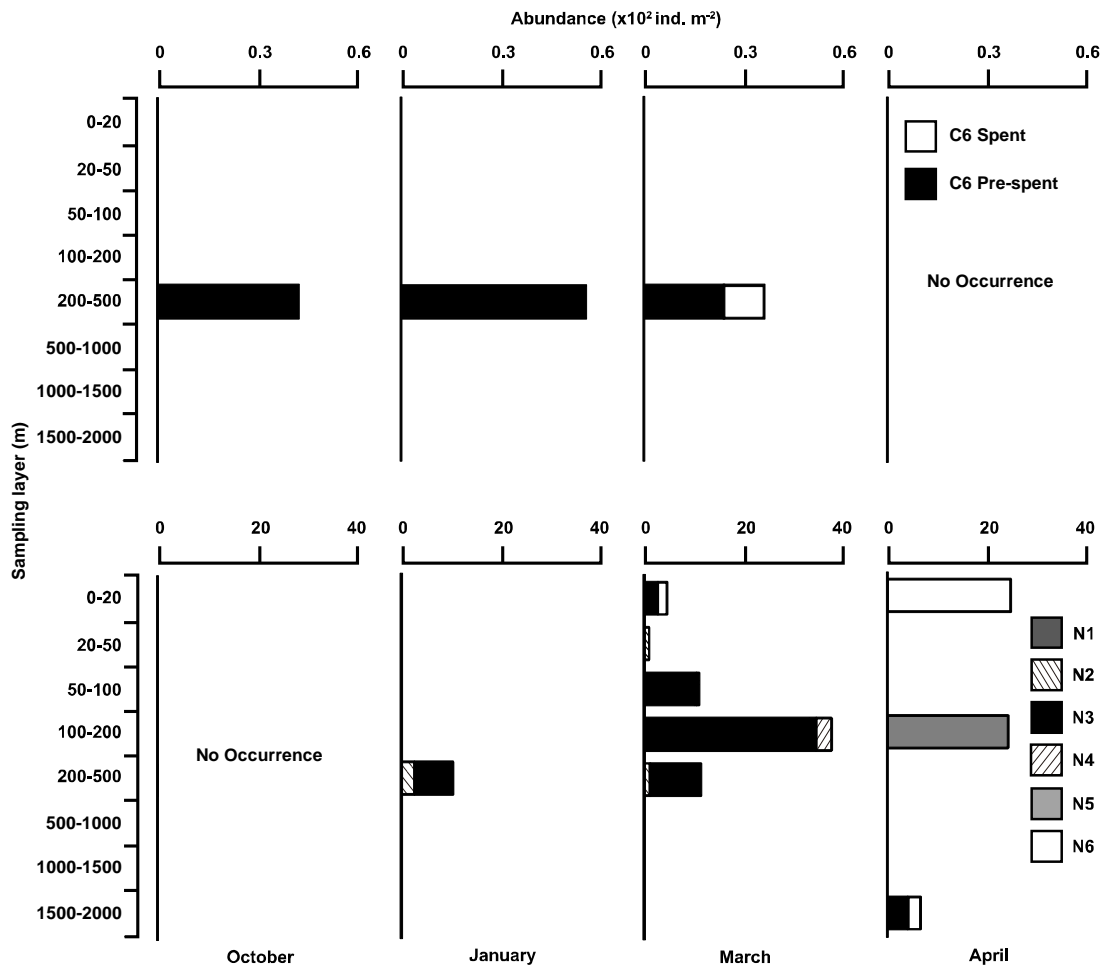


Fig.21. Vertical distribution of *Neocalanus flemingeri* large form C6 females (top) and developmental stages of nauplii (Bottom) in the Oyashio region from October 2009 to May 2010.

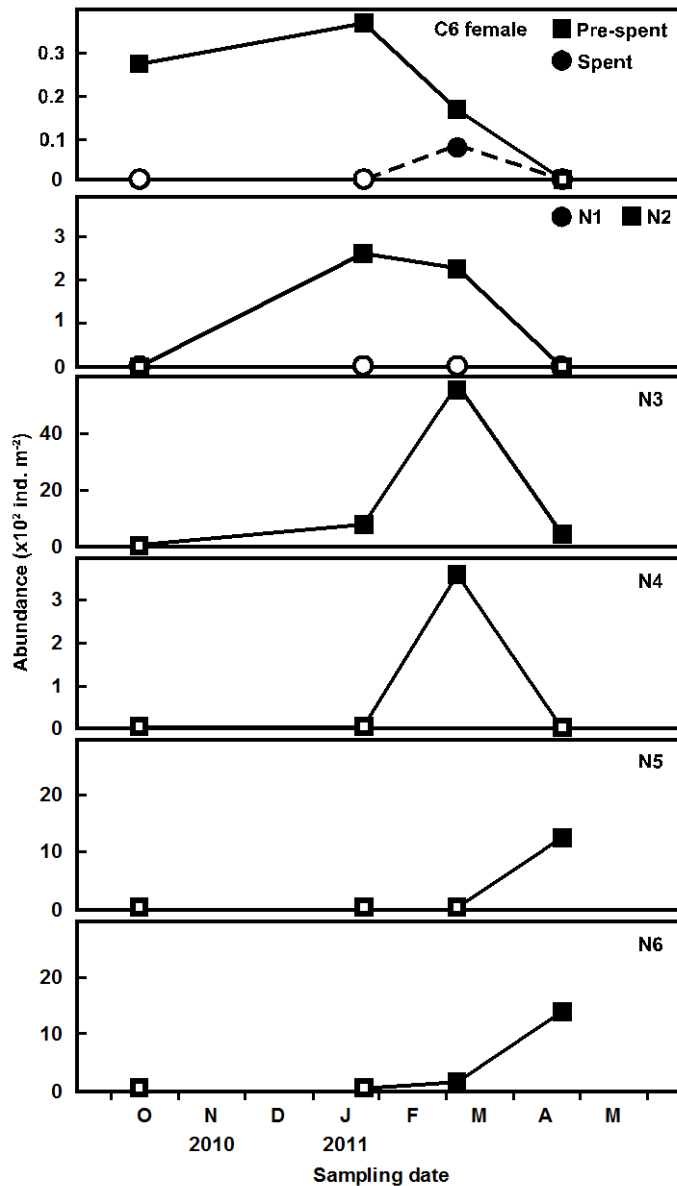


Fig.22. Seasonal changes in the standing stock of *Neocalanus flemingeri* large form C6 females and each developmental stage of nauplii in the Oyashio region from October 2009 to May 2010. Black marks represent occurrence, open marks represent no occurrence.

3.4.3.3. *Neocalanus plumchrus*

雌成体とノープリウス幼生の季節変化

Pre-spent は、採集期間（10月から翌年の5月）を通じて出現した（Fig. 23）。一方、spent は、10月からは出現せず、3月と5月から出現していた。

N1 は10月と1月から出現し、N2 は採集期間（10月から翌年の5月）を通じて出現した（Figs. 23、24）。N3 も採集期間を通じて出現し、個体数密度は10月から1月の間に約10倍に増加した（10月：4,410 ind. m⁻²；1月：45,900 ind. m⁻²）。3月におけるN3の個体数密

度は1月に比べると減少していたが (25,100 ind. m⁻²)、10月に比べ5倍以上高かった。N4以降の後期ノープリウス幼生は10月には出現せず、また、1月と3月においても後期ノープリウス幼生の個体数密度はN1~3に比べ少なく、それぞれ 73.5 ind. m⁻² と 607 ind. m⁻² を示した (Fig. 23)。4月は、後期ノープリウス幼生の個体数密度が3月に比べ大きく増加し (26,800 ind. m⁻²)、4月に出現した *N. plummchrus* ノープリウス幼生個体の70%を占めた。5月では、4月に比べて *N. plumchrus* ノープリウス幼生の個体数密度が減少し、採集期間を通じて最も少ない値を示した (4,750 ind. m⁻²)。

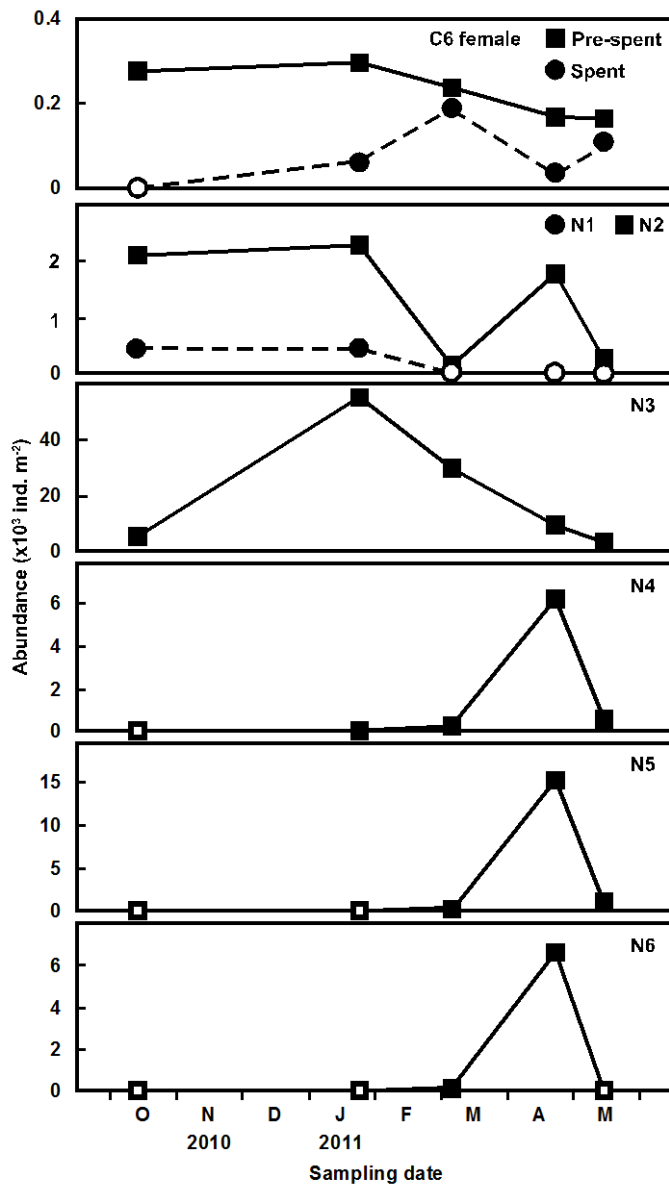


Fig.23. Seasonal changes in the standing stock of *Neocalanus plumchrus* C6 females and each developmental stage of nauplii in the Oyashio region from October 2009 to May 2010. Black marks represent occurrence, open marks represent no occurrence.

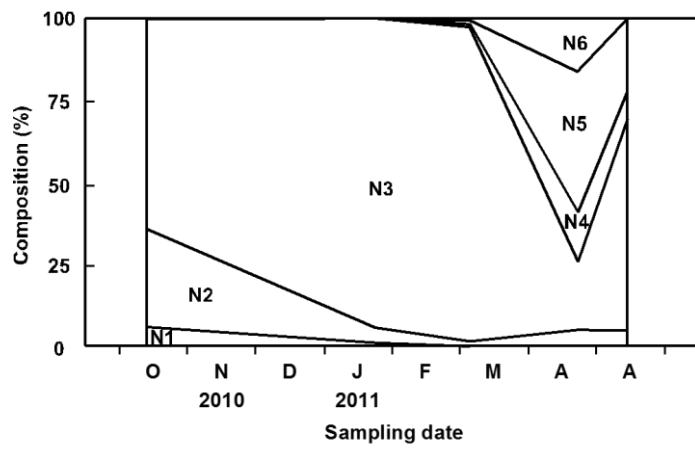


Fig.24. Stage composition of *Neocalanus plumchrus* nauplii in the Oyashio region from October 2009 to May 2010.

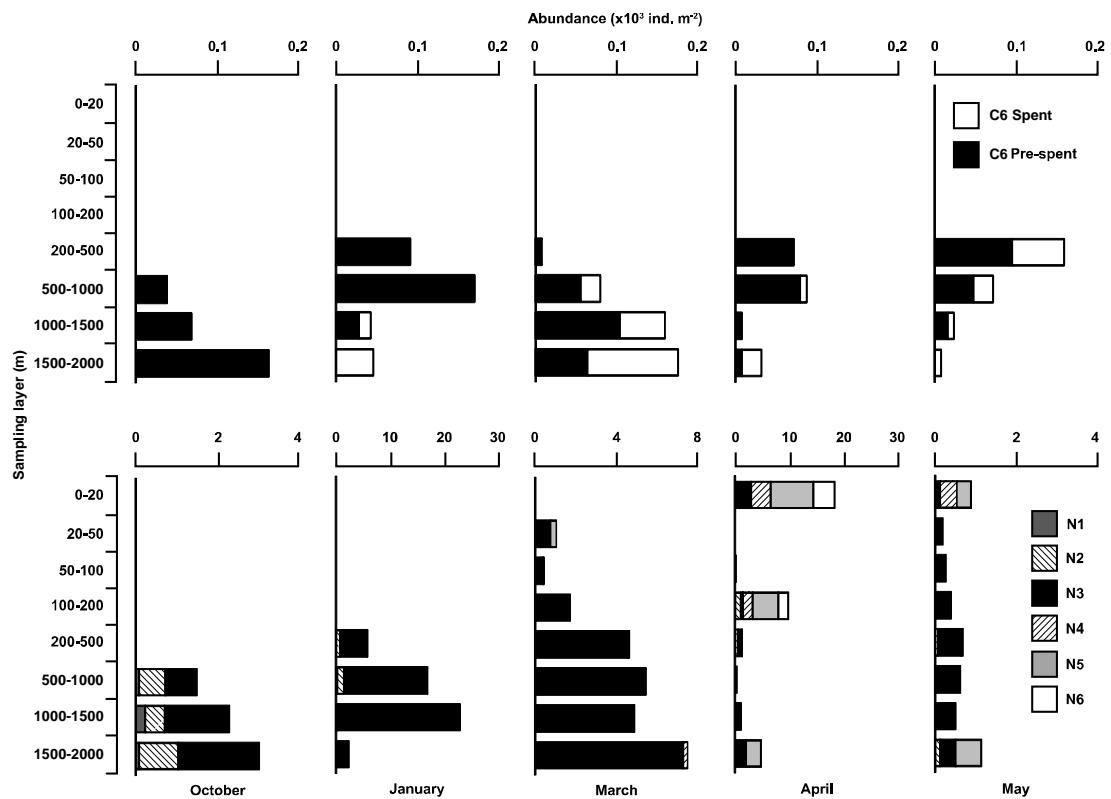


Fig. 25. Vertical distribution of *Neocalanus plumchrus* C6 females (top) and developmental stages of nauplii (Bottom) in the Oyashio region from October 2009 to May 2010.

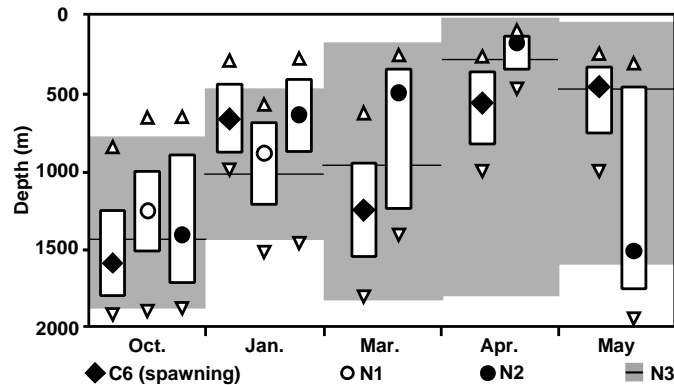


Fig.26. Seasonal changes in the median depth of the vertical distribution (D50%) of *Neocalanus plumchrus* C6 females (pre-spent), N1, N2 and N3 in the Oyashio region from October 2009 to May 2010. Vertical box represents the range of the distributions between D25% and D75%.

雌成体とノープリウス幼生の鉛直分布

採集期間（10月から翌年の5月）を通じて、*N. plumchrus* 雌成体は200 m以深から出現した（Fig. 25）。Pre-spentのD50%は10月が最も深く（1,590 m）、3月も比較的深い深度であったが（1,250 m）、その他の季節では450~658 mを示した（Fig. 26）。10月から4月では、spentはpre-spentに比べ深い層に分布し、5月では、spentとpre-spentがほぼ同じ層から出現していた。

Neocalanus plumchrus のN1とN2は、10月におけるD50%がそれぞれ1,260 mと1,410 m、1月は897 mと640 mを示した（Fig. 26）。これは、pre-spentのD50%とほぼ一致しており、10月と1月における産卵中の雌成体とN1、N2は同じ深度に分布したと考えられる（Fig. 26）。3月、4月、5月のN2は雌成体とは異なる深度から出現しており、4月に出現したN2は、D50%が186 mを示し、採集期間を通じて最も浅い深度に分布していた。N3のD50%は10月が最も深く（1,440m）、他の季節では浅くなり（283~1,050m）、pre-spentと似た変化を示した（Fig. 26）。また、N3は、他の发育ステージとは異なり、出現する水深が鉛直的に幅広く、N3のD25%~75%は、10月に1,100~1,730 mを示し、3月

では 425~1573 m に拡大した (Figs. 25、26)。この結果から、10 月から翌年の 3 月における N3 の鉛直的な分布範囲は、時間経過と共に拡大したと考えられる。N4~6 は、主に 0~20 m の表層から出現しており、4 月では出現した N4~6 (26,800 ind. m⁻²) の 50% 以上 (15,600 ind. m⁻²) が 0~20 m から出現し、N4 と N5 がそれぞれ 413 ind. m⁻² と 1,040 ind. m⁻² 出現した 5 月では、全ての N4 と 34% の N5 (352 ind. m⁻²) が 0~20 m から出現した (Fig. 25)。

3.5. 考察

本研究により、親潮域に生息する 3 種の *Neocalanus* 属カイアシ類の初期生活史解明に成功した。*Neocalanus* 属カイアシ類ノープリウス幼生の季節的な個体数密度、分布深度の変化を成長段階別に明らかにした研究は、本研究が初であり、先行研究の報告や仮説を検証すると共に、新たな生態学的知見の発見に成功したと言える。以下に 3 種の初期生活史と生存戦略について記述する。

3.5.1. *Neocalanus cristatus* の初期生活史

本研究の結果、10 月と 1 月におけるノープリウス幼生の個体数密度が他の月と比べ高かった (Fig. 13)。出現したノープリウス幼生の成長段階組成は 10 月と 1 月の間で大きく異なり、10 月では N1~3 ノープリウス幼生が 76% を占めていたのに対して、1 月に出現したノープリウス幼生は全て N4 以降だった (Fig. 14)。Kobari and Ikeda (1999) でも卵とノープリウス幼生の個体数密度が 12 月から翌年の 1 月に減少しており、1 月における *N. cristatus* の群集産卵速度は 12 月以前に比べ大きく減少したと考えられる。また、本研究の結果では 10 月に出現した *N. cristatus* ノープリウス幼生の 62% 以上が N3 だったことから、10 月よりも前に産卵のピークがあった可能性も示唆される。これらの結果から、*N. cristatus* の主要な産卵期は 10 月以前から始まり 12 月までだと考えられた。3 月以降、*N. cristatus* ノープリウス幼生の個体数密度は 1 月に比べ大きく減少した (Fig. 13)。しかし、

3月にはN3が再び出現しており、これは、1月に減少した卵生産が2月以降に再び増加したことを示している。*Neocalanus cristatus*には10~12月の産卵期以降にも産卵を行う集団が存在すると考えられる。先行研究でも、卵巣が発達した*N. cristatus*雌成体やC1が1年を通して出現したことから、同期的に産卵を行う集団とは異なるタイミングで産卵を行う個体群の存在が示唆されている (Kobari and Ikeda 1999; Tsuda et al. 2004)。

これまでの研究により、*N. cristatus*雌成体は主に500 m以深に分布していることが報告されている (Kobari and Ikeda 1999; Tsuda et al. 2004)。本研究でも雌成体は、採集期間を通じて主に500 m以深に分布しており、先行研究を支持する結果を得た (Figs. 15, 16)。*Neocalanus cristatus*の卵は正の浮力を有するため (Saito and Tsuda 2000; Yoshiki et al. 2011)、卵は産卵深度から上層で孵化すると考えられる。しかし、pre-spentの分布深度と、新たに明らかとなったノープリウス幼生の各成長段階の分布深度を比較すると、pre-spentとN1はほぼ同じ水深に分布しており、浮力による卵の鉛直移動は認められなかった。各成長段階のD50%には、N4とN6を除き有意な差異は認められなかった (Tukey-Kramer test; $p > 0.8$)。しかし、N4を除き、各成長段階のD50%は、成長段階が進むにつれて、浅い深度を示しており、1月と4月に出現したN6は50%以上の個体が200~500 mから出現した (Figs. 16, 17)。成長段階が進むにつれ、分布深度が上層に変化する結果は、本研究で初めて得られた知見と言える。*Neocalanus cristatus*ノープリウス幼生は、成長に伴い200~500 mに鉛直移動していると考えられる。Fig. 27に*N. cristatus*の初期生活史を模式的に示す。

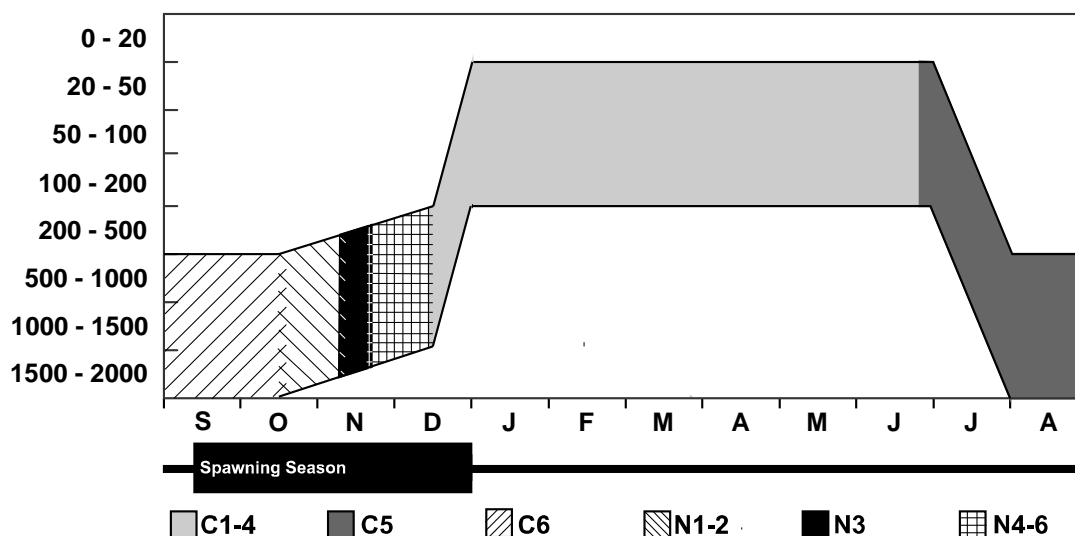


Fig.27. Schematic illustration of *Neocalanus cristatus* life history in the Oyashio region. Vertical distribution of *N. cristatus* copepodite from December to September are assumed from Kobari and Ikeda (1999), Tsuda et al. 2004 and Tsuda et al. (2014).

3.5.2. *Neocalanus flemingeri* の初期生活史

3.5.2.1. *Neocalanus flemingeri* small form の初期生活史

先行研究では、親潮域に生息する *N. flemingeri* S の主な産卵期は 1~2 月だと考えられている (Tsuda et al. 1999, Kobari and Ikeda 2001a)。 *Neocalanus flemingeri* S の卵は、5 日以内に孵化するため (Saito and Tsuda 2000)、N1 の出現期間から産卵期を推定できる。本研究の結果、*N. flemingeri* S のノープリウス幼生は 10 月から翌年の 3 月に全ての成長段階が出現しており、この期間に *N. flemingeri* S は産卵を行い、孵化したノープリウス幼生が後期ノープリウス幼生へ成長していると考えられる。また、10 月の試料から N1 が出現し、N3 が卓越していたことから 10 月以前から産卵を行っていた可能性も示唆される。N1 の個体数密度は、1 月が最も高く、3 月には減少していた (Fig.17)。1~3 月には spent の個体数密度が、pre-spent に比べ 2 倍以上に増加しており、後期ノープリウス幼生 (N5~6) の増加が認められた (Fig. 17)。さらに、親潮域における *N. flemingeri* S の C1 は 3 月に個体数密度が最も高い値を示すため (Tsuda et al. 1999, 2014, Kobari and Ikeda 2001a)、この

期間には産卵期が終わっていると考えられる。これらの結果から、親潮域の *N. flemingeri* S 産卵期は 10~2 月であり、産卵期のピークは 1~2 月だと考えられ、先行研究を支持する結果を得た。Pre-spent は、10 月には主に 500 m 以深に分布していたのに対して、1 月では主に 200~500 m 層から出現した (Fig. 19)。先行研究では、10 月に出現した雌成体の 90%以上が休眠状態であり、主に 500 m 以深に分布していた (Kobari and Ikeda 2001a)。この報告から、10 月に出現した pre-spent には休眠個体が含まれ、500 m 以深に分布していたと考えられる。また、Kobari and Ikeda (2001a)は、1 月に出現した雌成体の 50%以上が産卵中だったと報告しており、本研究で 1 月に出現した pre-spent の多くが産卵中だった可能性が高い。

Neocalanus flemingeri S のノープリウス幼生は主に 200 m 以浅から出現し、pre-spent より上層に分布していた (Figs. 19、20)。雌成体とノープリウス幼生の分布深度の差異は、本研究の結果初めて得られた知見と言える。初期のノープリウス幼生は遊泳器官が未発達なため、能動的な鉛直移動は困難だと考えられる。カイアシ類 *C. finmarchicus* や *Calanoides acutus* は、体内に含有する脂質による浮力調節を行っていると報告されている (Visser and Jonasdottir 1999; Pond et al. 2011)。*Neocalanus flemingeri* の卵と孵化したノープリウス幼生は油滴を持っているため (Saito and Tsuda 2000)、親潮域の表層環境で浮力を有し、受動的に移動している可能性が考えられる。N1、2 と N4 以降のノープリウス幼生の D50%には有意な差異が認められ、N4~6 は N1 と N2 より上層 (100 m 以浅)に分布していた (Fig. 20)。N3 の出現範囲 (D25%~D75%)は、全ての成長段階の中で最も広く、*N. flemingeri* S ノープリウス幼生は N3 期に鉛直移動を行っているとし唆された (Fig. 20)。これらの結果から、*N. flemingeri* S は孵化深度から、卵または初期ノープリウス幼生期間に上層に鉛直移動を行い、さらに N3 で 2 回目の鉛直移動を行い表層に移動していることが新たに判明した。移動した N3 は 100 m 以浅で摂餌し N4 以降のノープリウス幼生に成長すると考えられる。4 月に採集した雌成体は全て spent であり、また *N. flemingeri* S のノ

ノープリウス幼生は出現しなかった。これらの結果から、4月には *N. flemingeri* S の産卵期は終わり、ノープリウス幼生は全て C1 以降へ成長したと考えられる。*N. flemingeri* S の模式的な生活史を Fig. 28 に示す。

3.5.2.2. Small form と large form の初期生活史の差異

コペポダイト期を対象にした研究の結果、*N. flemingeri* S と large form の産卵期や鉛直移動のタイミングには差異が認められており、large form の産卵期間は12月から翌年の4月、C1 の出現は4~7月と報告されている (Tsuda et al. 1999; Tsuda et al. 2015)。本研究では、3月に出現した small form 雌成体は、spent 個体の割合が pre-spent を上回り、群集産卵速度の減少を示したのに対して、同月の large form では、出現した雌成体の60%以上が pre-spent だった。また、3月に large form の初期幼生 (N1、N2) が出現した。これらの結果から、small form とは異なり、large form の主要な産卵期間は3月以降も続いていると考えられる (Figs. 17、21)。10月を除き large form の雌成体は、全て200~500 m から出現しており、産卵は主に200~500 m で行われていると考えられる (Fig. 22)。Small form では、ノープリウス幼生が出現した10月から翌年の3月に全ての成長段階が出現したのに対して (Fig. 17、18)、Large form ノープリウス幼生の成長段階組成は、月ごとに大きく異なり、全ての成長段階が出現している月は認められなかった (Figs. 21)。1月と3月には N3 が優占していたのに対して、4月では、出現したノープリウス幼生の90%以上が N5 と N6 だった。親潮域における4月は、クロロフィル a 濃度が大きく上昇する月であり (Kasai et al. 2010)、また、large form の起源海域と考えられているオホーツク海においても4月に海氷融解に伴う植物プランクトンの増殖が報告されている (Kasai et al. 2010)。Large form は、N3 に植物プランクトン高生産期を利用して後期のノープリウス幼生に成長していると考えられ、植物プランクトン高生産期に依存した生活史を持っている可能性がある。

本研究の結果から、large form と small form の産卵期やノープリウス幼生の出現期間に差異が認められ、両個体群は異なる初期生活史を持つと考えられる。しかし、本研究結果は、*N. flemingeri* L の正確な初期生活史を解明できたとは言い難い。本研究の real-time PCR を用いた種同定方法では、 C_q 値 35 以下を示した個体を全て *Neocalanus* 属以外の別種として同定している。Nefl による real-time PCR では large form は small form に比べて C_q 値が高く、結果として、DNA 濃度が低い large form ノープリウス幼生（例えば破損個体や初期ノープリウス幼生）を別種として誤同定している可能性がある。本研究の large form の種同定結果は、初期ノープリウス幼生を過小評価した可能性が高く、正確な種同定結果とは言えない。また、*N. flemingeri* L は主にオホーツク海に分布していると考えられ、親潮域の large form はオホーツク海とは異なる挙動を示す移流種である可能性がある。*Neocalanus flemingeri* L の初期生活史解明には、種同定方法を改良すると共に、オホーツク海で継続的に採集した試料の解析を行う必要があると考えられる。

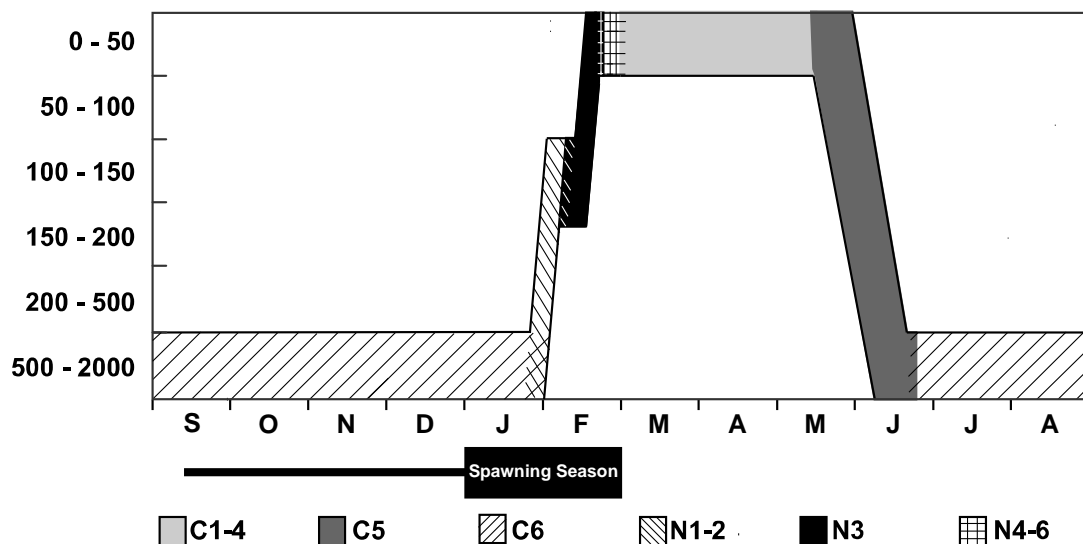


Fig.28. Schematic illustration of *Neocalanus flemingeri* small form life history in the Oyashio region. Vertical distribution of *N. flemingeri* small form copepodite from March to September are assumed from Tsuda et al. (1999), Kobari and Ikeda (2001a), and Tsuda et al. (2014).

3.5.3. *Neocalanus plumchrus* の初期生活史

本研究では、pre-spent が採集期間（10月から翌年の5月）を通じて出現しており（Fig. 23）、成熟した卵を持つ雌成体の出現期間が10月から翌年の5月と報告した先行研究と同様の結果を得た（Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2001b）。N1は10月から翌年の1月、N2は採集を行った全ての月から出現した。本研究の200 m以深の平均水温（ $2.6 \pm 0.54^\circ\text{C}$ ）では、*N. plumchrus* の孵化日数は約5日間である（Saito and Tsuda 2000）。N1の滞留時間は本研究結果のみでは推定できない。そこで、*N. plumchrus* と同様にN3から摂餌を開始する *Calanus* 属ノープリウス幼生の飼育実験の結果と、Saito and Tsuda (2000)により測定された 2°C と 4°C における孵化からC1までの滞留時間を使用してN1の滞留時間を推定した。Landry (1983)は *C. pacificus* ノープリウス幼生の飼育実験を行い、N1の滞留時間はノープリウス幼生期の約11.5%と報告し、同様に *C. finmarchicus* のN1滞留時間は、ノープリウス幼生期の約13.2%と報告されている（Hygum et al. 2000）。これらの結果から、*N. plumchrus* におけるN1の滞留時間は、ノープリウス幼生期の約12%と仮定した。200 m以深の平均水温（ $2.6 \pm 0.54^\circ\text{C}$ ）ではN1の滞留時間は約5日間であり、産卵から孵化したノープリウス幼生がN2へ成長するまで約10日間必要だと推定された。本研究では、推定したN1の滞留時間およびpre-spentとN2の出現期間から、親潮域における *N. plumchrus* の産卵期は10月から翌年の5月まで（約7カ月間）続くと考えられ、先行研究を支持する結果を得た。

本研究では、雌成体の分布深度が秋季から春季にかけて変化しており、先行研究と同様の結果を得た（Kobari and Ikeda 2001a）。また、本研究の結果、10月、1月におけるN1、N2のD50%はpre-spent雌成体とほぼ同じであり、1月は10月に比べ浅い深度を示した（Fig. 26）。これらの結果から、*N. plumchrus* の産卵深度は10月から翌年の1月にかけて、より浅い層に変化したと判明した。飼育実験の結果から、*N. plumchrus* の卵と初期ノープリウス幼生は浮力を持たないと考えられている（Saito and Tsuda 2000）。また、加圧装置

によって 1~100 atm の深層環境を再現した飼育実験においても、浮力は確認されていないため (Yoshiki et al. 2011)、初期ノープリウス幼生は主に産卵深度に分布すると考えられる。しかし、3 月以降に出現した N2 と pre-spent は異なる D50%を示していた (Fig. 26)。3 月と 5 月で D50%に差異が生じた原因として、N2 の個体数が他の月と比べ低く、各水層に散在的に出現したので、N2 の正確な D50%値が算出できなかったことが考えられる (Fig. 26)。また、3 月の 200 m 以浅では、水温、塩分ともに他の月より低い値を示し (Fig. 11)、沿岸親潮水の流入が認められた (Kusaka et al. 2009)。沿岸親潮水と共に沿岸域由来の *N. plumchrus* N1~2 が輸送されきた可能性も考えられる。4 月では N2 が、pre-spent に比べ上層に分布しており (Fig. 26)、100~1500 m の 4 層から出現し、散在的な出現が認められなかった (Figs. 25、26)。4 月における *N. plumchrus* 初期ノープリウス幼生は、受動的に産卵深度から上層に鉛直移動した可能性がある。

本研究の結果、N4 以降の後期ノープリウス幼生が 10 月から翌年 3 月の間にほとんど出現しなかった (Figs. 23、24)。この結果から、先行研究の仮説に基づき 2 つの可能性が考えられる。(1); 10 月から翌年の 3 月までの *N. plumchrus* のノープリウス幼生は、N3 以降の死亡率が高い、(2); 10 月から翌年の 3 月までの *N. plumchrus* ノープリウス幼生は、N3 で成長を停滞させている。N3 以降の死亡要因として、飢餓と被食が考えられる。本研究の結果、*N. plumchrus* N3 の個体数密度が 10 月から翌年の 3 月までに 5~10 倍以上に増加しており (Fig. 23)、飢餓により N3 が大きく減少したとは考え辛い。また、近縁種である *N. flemingeri* と *N. cristatus* の後期ノープリウス幼生は 10 月から翌年の 3 月の間に出現しており (Figs. 13、17)、体サイズや形態が同じ *N. plumchrus* の後期ノープリウス幼生のみが選択的な捕食を受けているとは考えづらい。さらに、*N. plumchrus* の初期コペポダイト期は秋から翌年の冬季まで出現しないのに対して、*N. flemingeri* と *N. cristatus* の初期コペポダイト期は出現すると報告されている (Miller and Clemons 1988; Kobari and Ikeda 1999, 2001a, b; Tsuda et al. 1999, 2004, 2014)。これらの結果から、*N. plumchrus* は

N3に成長を停滞させていると考えられる。10月から翌年の4月に認められたN3の鉛直的な分布範囲の拡大は、長期に渡る産卵期、産卵個体が行う鉛直移動、そしてN3の成長停滞によって生じた可能性が高い (Fig. 26)。Fig. 29に模式的な *N. plumchrus* の生活史を示す。

本研究の結果、個体によってはN3期に5カ月間以上の成長停滞期間を有することが示された (Fig. 29)。一般的に、卵および初期ノープリウス幼生の死亡率は以降のコペポダイト期と比べて高く、*Calanus* 属カイアシ類では、卵と初期の死亡率が 0.2 day^{-1} 以上と報告されている (Eiane et al. 2002; Eiane and Ohman 2004; Ohman et al. 2002, 2004; Hirst et al. 2007)。そのため、ノープリウス幼生期の滞留時間が長い場合、コペポダイト期に成長する前に個体数が大きく減少すると考えられる。本研究で得られたデータから、*Neocalanus* 属カイアシ類のノープリウス幼生の死亡率算出は困難であり、また、これまでノープリウス幼生の死亡率を算出した先行研究は存在しないため、直接的な *Neocalanus* 属と *Calanus* 属の死亡率の比較はできない。しかし、capital breeding 型である *Neocalanus* 属と、income breeding 型である *Calanus* 属は、異なる産卵様式を持つカイアシ類であり、生活史の特徴からノープリウス幼生期の死亡率が大きく異なる可能性が高い。*Neocalanus* 属と *Calanus* 属の生活史における顕著な違いは、産卵深度と初期ノープリウス幼生の分布深度であり、*Neocalanus* 属が深層で産卵し初期ノープリウス幼生が深層に分布するのに対して、*Calanus* 属は有光層内で産卵を行う。可視光線は深度が深くなるにつれて減衰するため、深層は表層に比べて、視覚捕食者の探餌能力が低下すると考えられる (Aksnes and Giske 1993)。表層に分布する *Calanus* 属の卵やノープリウス幼生は、*Neocalanus* 属に比べて被食リスクが高い可能性がある。また、*Calanus* 属の卵やノープリウス幼生にとっての捕食者には同属の親個体も含まれ、親個体による共食いが、卵やノープリウス幼生の主要な死亡要因となっている場合も報告されている (Ohman and Hirche 2001; Ohman et al. 2004; Bonnet et al. 2004; Basedow and Tande 2006)。一方、*Neocalanus* 属の成熟した個体は、下顎の咀嚼器を失い、摂餌を行わないと報告されており (Miller et al. 1984)、

Neocalanus 属は *Calanus* 属に比べ共食いリスクは低い。これらの結果から、*Neocalanus* 属のノープリウス幼生期の死亡率は *Calanus* 属に比べて低いと考えられる。

本研究により、親潮域に生息する 3 種の *Neocalanus* 属カイアシ類の初期生活史解明に成功した。3 種は、それぞれ固有の季節性を持って成長し、鉛直移動を行っており、*Neocalanus cristatus* のノープリウス幼生は、200 m 以深に分布し、成長段階が進むにつれて、より上層に鉛直移動していると考えられる。*N. flmeingeri* のノープリウス幼生は、主に 200 m 以浅に分布し、卵または N1~2 と N3 で表層へ鉛直移動を行い、後期ノープリウス幼生に成長すると示唆される。*N. plumchrus* は、N3 で成長を停滞させ、3~4 月に同期的に鉛直移動を行い、表層で後期ノープリウス幼生に成長していると考えられる。ノープリウス幼生期は、形態的な同定が困難であることに加え、滞留期間がコペポダイト期と比べ短く、カイアシ類の生活史研究において知見が乏しかった。そのため、初期生活史は、産卵期と C1 の出現期間や深度から推定される場合がほとんどだった。しかし、本研究の結果から、近縁種 3 種が、全く異なる初期生活史を持つことが判明した。3 種は初期生活史においても、異なる生存戦略を持ち、同所的に生息していることが明らかとなった。

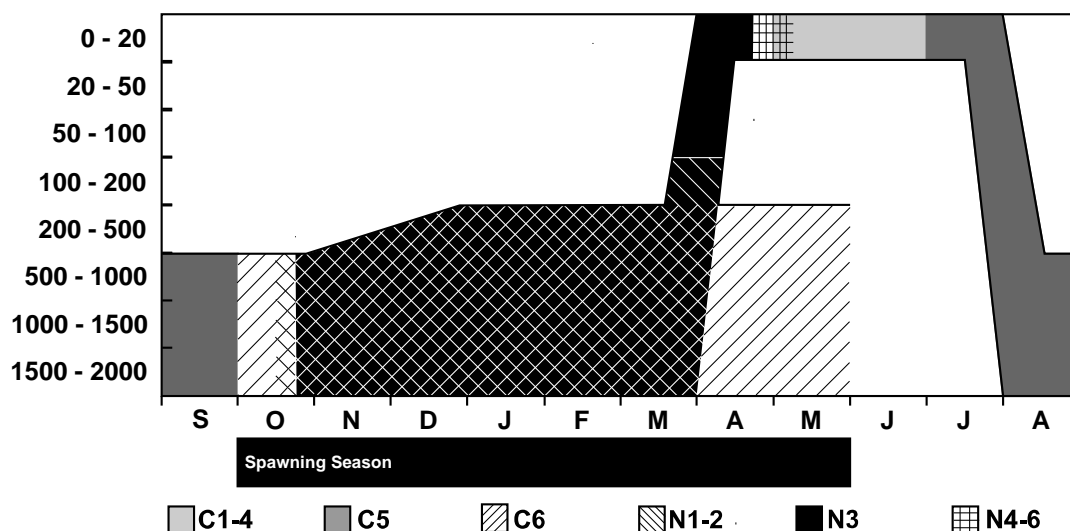


Fig.29. Schematic illustration of *Neocalanus plumchrus* life history in the Oyashio region. Vertical distribution of *N. plumchrus* copepodite from May to September are assumed from Tsuda et al. (1999), Kobari and Ikeda (2001a), and Tsuda et al. (2014).

第4章 *Neocalanus* 属カイアシ類における体色変化について

4.1. 諸言

Neocalanus 属の体色に関する示唆を含む研究報告が、2本存在する。Ohman et al. (1989)は *Neocalanus tonsus* から色素を抽出し、他のカイアシ類と同様に主要な含有色素がアスタキサンチンであると示唆している。Ikeda et al. (2004)は、親潮域に分布する *N. cristatus* を 250 m 以浅と 1000~2000 m からそれぞれ採集し、形態の観察や生化学的な解析を通して比較を行った。その結果、250 m 以浅から採集した個体は、体色を持たず半透明であり、飼育環境下で光や物理的な刺激に対して明瞭な逃避行動を示した (Ikeda et al. 2004)。一方で、1000 m 以深から採集した個体は赤色を示し、光や物理的な刺激に対して顕著な逃避行動は認められなかったと報告している (Ikeda et al. 2004)。深層から採集した個体は、これらの特徴の他に、脂質含有量が高く、RNA/DNA が表層個体に比べ低い値を示し、休眠状態を示す特徴を有していた (Ikeda et al. 2004)。*Neocalanus cristatus* は深層への鉛直移動や休眠行動に伴い、体色が変化すると考えられる。しかし、Ikeda et al. (2004)は、赤色個体の存在を示唆したのみであり、赤色化のメカニズムや変化要因に関する解析は行っておらず、赤色化による生存戦略についても考察していない。

海洋性カイアシ類における鉛直移動に伴う体色の変化は、Vestheim et al. (2005)および Vestheim and Kaartvedt (2006)によってカイアシ類 *Pareucheata norvegica* から報告されている。Vestheim et al. (2005)は、50~100 m と 100~150 m で、それぞれ *P. norvegica* を採集し、体色を比較した結果、前者の体色は口器や体節に赤色が点在しているのみで、半透明だったのに対して、後者の赤色部位は前者に比べ明瞭に広い範囲に広がっていた。*Neocalanus cristatus* と *P. norvegica* は暗条件下で赤色化しており、有害波長光から細胞を防御する目的とは異なる用途でアスタキサンチンを利用し、体色を変化させていると考えられる。また、海洋環境における紫外線は約 20 m 以浅で熱エネルギーに変換されるため

(Kuhn et al. 1999; Hylander and Hansson 2013)、ニューストーン性の種を除き、大部分の浮遊性カイアシ類は紫外線の影響を受ける深度以深に分布するか、鉛直移動を行い逃避することが出来る。また、200 m 以深まで透過する太陽光は、僅かな可視光のみであり、深層に分布するカイアシ類にとって光酸化作用による悪影響は極めて小さいと考えられる。

200 m 以深では、赤色、紫色、濃茶色や黒色の体色を持つ動物プランクトンやネクトンが優占している (Herring 1973; Herring and Roe 1988)。赤色の体色を持つ深層性十脚類 *Oplophorid* sp. に 440~500 nm 波長光を照射したところ、他の体色を持つ深層性生物に比べ低い反射率を示したと報告されており (Johnsen 2005)、赤色は深層の弱い青~緑光を吸収するため、視覚捕食者に対して高い隠蔽効果があると考えられている (Herring and Roe 1988)。また、深層に分布する生物の約 90%が生物発光を発すると報告されており (Herring 1983)、深層に分布する生物の赤色体は、生物発光に対しても高い隠蔽効果があると考えられている (Widder et al. 1983; Johnsen 2002)。*Neocalanus* 属カイアシ類は、鉛直移動を行い、休眠に伴いアスタキサンチンを利用して体色を透明から赤色に変化させ、深層の暗条件下で隠蔽効果を得ている可能性がある。

本研究では親潮域にて、深層へ移動を行う *Neocalanus* 属 3 種の C5 または雌成体を 0~200、200~500、500~2000 m から採集し、体色の比較を行う。色素含有量の変化と体色の変化は、必ず対応しているとは限らず (Foxton 1970; Herring 1973)、色素胞の収縮によっても体色は変化する (Miner et al. 2000; Mori and Dhugal 2008)。そこで、本研究では、採集直後に、試料の画像撮影を行い、画像を解析することによって個体の赤色面積率を算出した。また、Ikeda et al. (2004)による研究では、赤色化と休眠の関連性が示唆されているため、画像解析の際に、休眠の指標となる油球面積率も計測した。本章は、これらの解析を行い、*Neocalanus* 属 3 種における赤色化の有無を検証すると共に、体色変化による生存戦略について考察する。

4.2. 材料と方法

4.2.1. 試料採集

試料の採集は、独立行政法人東北区水産研究所若鷹丸及び北海道区水産研究所北光丸に乗船し、北海道南東、親潮域の観測点 A4 (42° 15.0' N; 145° 07.5' E) と A11 (40° 30.0' N; 146° 00' E) で行った。試料は、2013 年の *N. plumchrus* と *N. cristatus* の C5 が深層に鉛直移動を行う 5 月、*N. flemingeri* C5 が深層に鉛直移動を行う 7 月に行った。5 月の採集は A4 と A11 にて、それぞれ 04:09~04:54、09:12~10:12 に、7 月の採集は A4 と A11 にて、それぞれ 16:58~17:41、01:18~02:05 に行った (Table 8)。採集には VMPS (目合: 100 μm 、口径: 0.25 m²、Terazaki and Tomatsu 1997) を使用し、0~200、200~500、500~2000 m から層別採集を行った。採集試料から *N. plumchrus*、*N. cristatus* の C5 を種同定し、画像の撮影まで暗所に静置した。また、*N. flemingeri* は雌成体で休眠をするため、200 m 以深から採集した試料から、*N. flemingeri* の雌成体を同定した。採集から 2 時間以内に、種同定した試料は、実体顕微鏡 (Leica MZ9.5) で Leica DFC 280 カメラを用いて個体の側面から前体部を撮影し、TIFF ファイル形式 (1920×1536 画素) にて画像を保存した。

Table 8. Zooplankton sampling date in the Oyashio region. HK: FRV *Hokko Maru*, WK: FRV *Wakataka Maru*, V: VMPS net.

Ship	Station	Sampling time	Date	Net	Sampling layers (m)
WK	Stn A11	09:12-10:12	05/14/2013	V	0-200, 200-500, 500-2000
WK	Stn A4	04:09-04:54	05/16/2013	V	0-200, 200-500, 500-2000
WK	Stn A11	01:18-02:05	07/22/2013	V	0-200, 200-500, 500-2000
WK	Stn A4	16:58-17:41	07/24/2013	V	0-200, 200-500, 500-2000

4.2.2. 解析方法

撮影した画像から、画像解析ソフト Image J (Abràmoff et al. 2004)を用いて、前体部と油球の面積を測定し、油球面積率 (%)を算出した。また、赤色範囲の特定には、前体部の画像を色相、明度、彩度に分割し、各画素を 255 段階の輝度に変換した彩度の画像を使用した。赤色模様を呈した個体の画像を用いて、赤色部位のみを含む輝度の範囲を手動で決定し、その輝度範囲を使用して赤色範囲の特定を行い、赤色面積を算出した。ただし、5月と7月では、撮影時の光環境が異なり、5月は蛍光灯の直射光と、冷光源照射装置 (CLS 150X)を用いた 21V 150W ハロゲンランプによる透過光で撮影を行ったのに対して、7月は蛍光灯の直射光と、実体顕微鏡 (Leica MZ9.5)の 6V 20W ハロゲンランプによる透過光で撮影を行った。彩度は光環境によって変化するため、5月と同じ輝度範囲で7月の画像解析を行ったところ、茶色を呈する体組織が凝集した部位や、刺毛が密集する部位を赤色部位として認識し、正確な赤色部位の特定が困難だった。そこで、彩度から求める赤色部位と顕微鏡観察で認められる赤色部位が一致するように、彩度の輝度範囲を5月では 110~255、7月では 150~255 に設定し、それぞれを各月で撮影した画像で用いることで赤色範囲を特定し面積を算出した。測定した赤色面積と前体部面積から赤色面積率 (%)を算出した。

各深度における赤色面積率の比較には、分散の均一性の検定として Bartlett 検定を行い、等分散とみなされるものについては一元配置分散分析 (one-way ANOVA)を、等分散とみなされないものについては Kruskal-Wallis の順位検定を行った。また、one-way ANOVA、Kruskal-Wallis 検定の結果、有意差が認められた場合は、それぞれ、Tukey 法、または Steel-Dwass 法による多重比較を行った。赤色面積率と油球含有率の比較には Spearman の順位相関を用いた。全ての検定における信頼区間は 95%とし、統計解析には JMP® 11 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。

4.3. 結果

4.3.1. 分布深度の変化に伴う赤色面積率変化

7月に採集した *N. cristatus* C5 では、分布深度の変化に伴う赤色面積率の変化が認められ (Fig. 30a; Kruskal-Wallis test、 $p < 0.0001$)、500~2000 m から出現した個体が、500 m 以浅から出現した個体に比べて有意に赤色面積率が高かった (Steel-Dwass test、 $p < 0.0005$)。500 m 以浅からは出現した *N. cristatus* C5 は全て 10%以下の赤色面積率を示し、口器、油球末端の一部や、体節縁辺が赤色を呈し、赤色の斑点が背側に不均一に散在した (Fig. 31a)。また、口器や体節縁辺のみ赤色を呈する個体も出現した。500~2000 m から採集した *N. cristatus* C5 の赤色面積率は 1~61%を示し (Fig. 30a)、基本的に、200 m 以浅の個体と同じ部位が赤色を呈した。しかし、高い赤色面積率 (48.6%)を示した個体は、赤色部位が顕著に広く、口器、体節縁辺、油球末端に加え、赤色部位は頭部の一部を除き、前体部全体に樹状に広がっていた (Fig. 31b)。

7月に採集した *Neocalanus plumchrus* C5 では、3層からそれぞれ採集した個体の赤色面積率に有意な差異は認められなかった (Fig. 30b; one-way ANOVA、 $p = 0.0738$)。また、同じく 7月に採集し、共通の輝度範囲 (150~255)で赤色部位を特定した *N. cristatus* に比べ赤色面積率が低く、*N. cristatus* の最大赤色面積率が 61.1%なのに対して、*N. plumchrus* では 6.74%だった。*N. plumchrus* C5 の赤色部位は、500 m 以浅から採集した *N. cristatus* C5 と同様であり、口器、体節縁辺、油球末端の一部分が僅かに赤色を呈しており、不均一な斑点が背側に散在していた (Fig. 31c、d)。*Neocalanus cristatus* C5 ほど顕著な変化は認められなかったが、赤色面積率が異なる *N. plumchrus* C5 の体色パターンを比較すると、200 m 以浅から採集した比較的高い赤色面積率(2.47%)を示した個体に比べ、500~2000 m から採集した低い値 (0.846%)を示した個体は、油球末端の赤色範囲が縮小しており、背側の斑点模様が欠如していた (Fig. 31c、d)

5月に採集した *N. flemingeri* では、3層からそれぞれ採集した C5 と雌成体の赤色面積

率に有意な差異は認められなかった (Fig. 30c; Kruskal-Wallis test、 $p = 0.6837$)。赤色部位は、*N. plumchrus* C5 と 500 m 以浅の *N. cristatus* C5 と同様の部位に加えて、頭部の背側に赤色斑点を持つ個体が認められた (Fig. 31f)。*N. flemingeri* C5 と雌成体には、*N. cristatus* ほど顕著な体色パターンの変化は認められなかった。赤色面積率の異なる個体を比較すると、200 m 以浅から採集した比較的低い赤色率を示す個体 (4.87%)は、200 m 以深から採集した赤色率 9.03%の個体に比べ、口器や油球末端部分の赤色部位が縮小していた (Fig. 31e、f)。

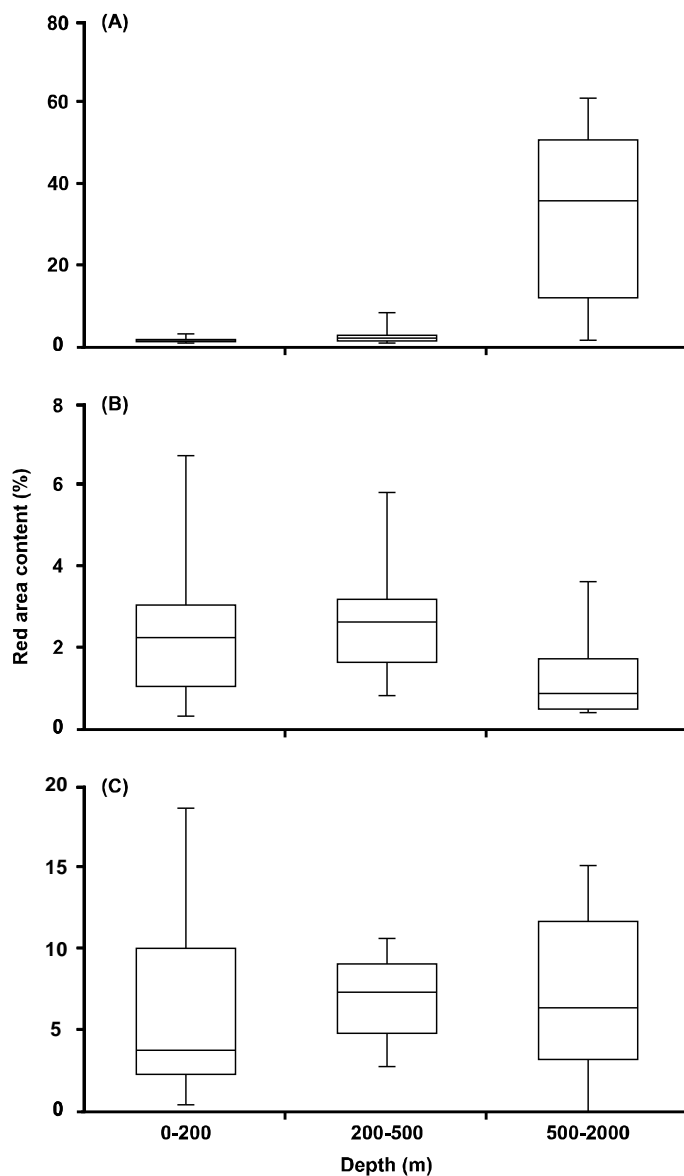


Fig.30. Depth changes in red area content of (A) *Neocalanus cristatus* C5, (B) *N. plumchrus* C5 (C) *N. flemingeri* C5 and C6 at 2013 May and July in the Oyashio region. Box represent median values and 25th and 75th percentiles. Bar represent 10th and 90th percentiles.

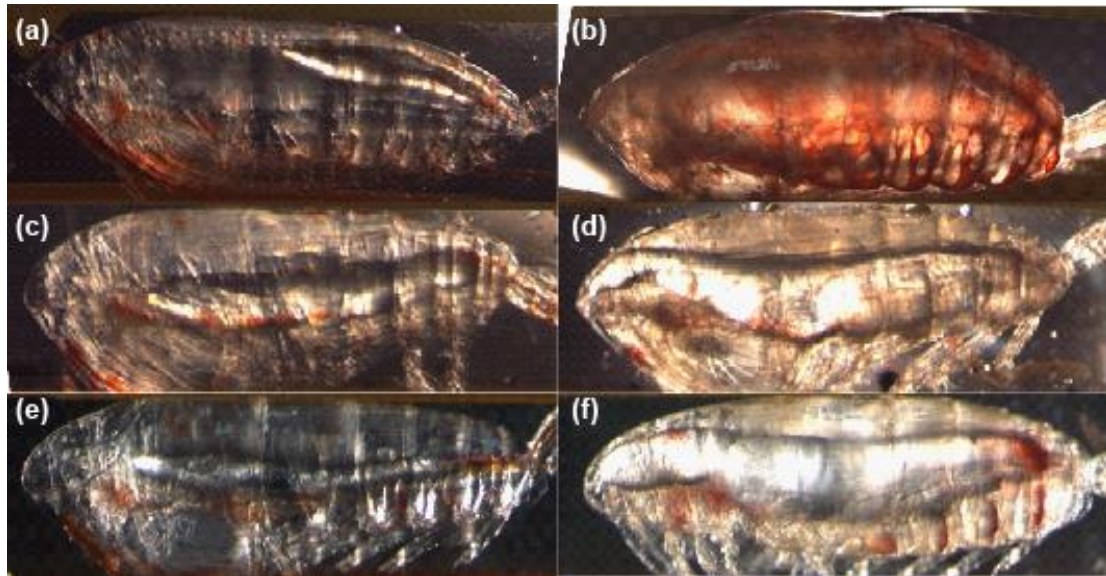


Fig.31. Photographs of individuals of C5 and C6 female of *Neocalanus* spp. (a) *N. cristatus* C5 from 0 - 200 m with 1.8% of red rad area ratio, (b) *N. cristatus* C5 from 500 - 2000 m with 48.6% of red area ratio, (c) *N. plumchrus* C5 from 0 - 200 m with 2.47% of red ratio, and (f) *N. plumchrus* C5 from 500 - 2000 m with 0.846% of red area ratio, (e) *N. flemingeri* C5 from 0 - 200 m with 4.87% of red area ratio, (d) *N. flemingeri* C6 from 500 - 2000 m with 9.03% of red area ratio.

4.3.2. 油球面積率と赤色面積率の関係

7月に0~500 mと500~2000 mから採集した *N. cristatus* C5の油球面積率 (%)と赤色面積率 (%)には、正の相関関係が認められ (Fig. 32a; Spearman の順位相関、0~500 m: $r^2 = 0.165$, $p < 0.009$, 500~2000 m: $r^2 = 0.394$, $p < 0.007$)、より大きな油球を持つ個体ほど、広い赤色面積を持つことが示された。0~500 m および 500~2000 m、両層において相関が認められたが、500~2000 m から採集した *N. cristatus* C5 は油球面積率に対して、より大きな傾きの相関関係が認められたので、*N. cristatus* C5 の赤色面積率は、主に 500 m 以深に移動した後に増加していると考えられる。

7月と5月に、0~500 m と 500~2000 m から採集した *N. plumchrus* C5 と *N. flemingeri* C5 と雌成体の油球面積率と赤色面積率には、有意な相関関係は認められなかった (Fig. 32b, c; Spearman の順位相関、 $r^2 < 0.0473$, $p > 0.284$)。

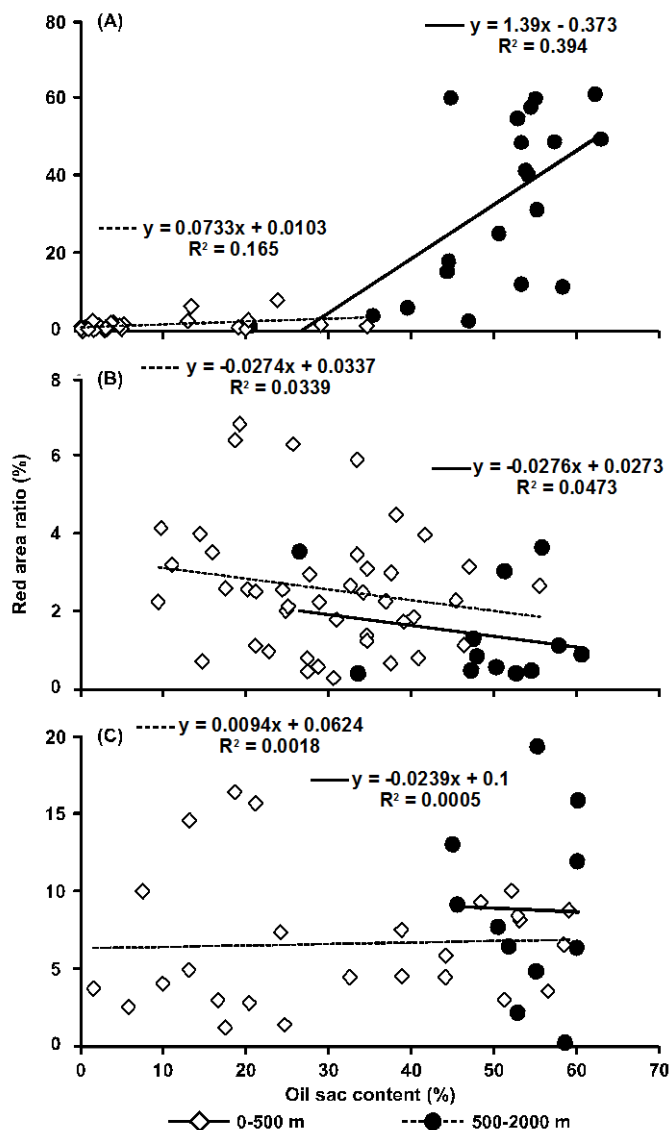


Fig.32. Scatter diagrams of individual oil sac content to individual red area content for (A) *Neocalanus cristatus* C5, (B) *N. plumchrus* C5, and (C) *N. flemingeri* C5 and C6 at 2013 May and July in the Oyashio region collected from 0 - 500 m (open symbols) and from 500 - 2000 m (closed symbols). Regression lines are significant for *N. cristatus* C5 collected from 0 - 500 m and 500 - 2000 m (see details in text).

4.4. 考察

本研究の結果、500~2000 m に分布する *N. cristatus* C5 の赤色面積率が、500 m 以浅に分布する集団に比べて有意に高かった (Fig. 30a)。この結果から、*N. cristatus* C5 は *P. norvegica* と同様に鉛直移動を行い、体色を半透明から赤色に変化させていると考えられる (Vestheim and Kaartvedt 2006)。本研究で解析に使用した 200 m 以深から採集した *Neocalanus* 3 種は、採集中に 200 m 以浅の光環境を経験しており、撮影を行う前に赤色面

積率が変化した可能性がある。しかし、*P. norvegica* を用いた飼育実験では、表層の光環境を経験した赤色個体を暗所で 24 時間飼育しており、体色の変化は報告されていない (Vestheim et al. 2005)。この結果から、本研究で使用した *Neocalanus* 3 種の赤色面積率が、撮影前に大きく変化した可能性は低いと考えられる。本研究では、*N. cristatus* C5 の油球面積率と赤色面積率に、正の相関関係が認められた (Fig. 32a)。さらに、500~2000 m に分布する集団は 0~200 m より、大きな傾きを示し、*N. cristatus* C5 は 500 m 以深に鉛直移動を行った後に体色を透明から赤色に変化させていると考えられる。しかし、顕著な体色変化が認められたのは *N. cristatus* のみであり、*N. plumchrus* と *N. flemingeri* では、異なる深度に分布する個体の赤色面積率に有意な差異は認められなかった (Figs. 30, 32)。これらの結果から、*N. cristatus* には、他の 2 種とは異なる、体色変化をともなう生活史を持つと考えられる。

4.4.1. 体色変化の方法

動物プランクトンは、体内の色素胞収縮や、色素含有量の変化によって体色を変化させる。色素胞収縮による体色の変化は単脚類 *Vibilia stebbingi* で報告されており、明色時に *V. stebbingi* の体表には、小さな黒点模様が均一に点在し、暗色時には色素胞に凝集した色素顆粒が拡大することで体色が変わる (Mori and Dhugal 2008)。本研究では、明色時の *V. stebbingi* のように、赤色斑が均一に点在する *N. cristatus* C5 は出現せず、*N. cristatus* C5 の赤色素は、口器、体節縁辺、油球末端部に集中して存在していた。また、500~2000 m から採集した *N. cristatus* C5 の赤色部位は、上記部位以外にも樹状に広がっており、色素胞の収縮のみで体色を変化させているとは考えづらく、*N. cristatus* C5 は、色素の蓄積によって体色を変化させている可能性が高い。

カイアシ類は植物プランクトンから β -carotene や zeaxanthin を取り込むことで、アスタキサンチン色素を合成するため (Matsuno 2001)、色素の含有量は摂餌した植物プランク

トンの量に大きな影響を受けると考えられている (e.g. Juhl et al. 1996)。摂餌量変化に伴う含有色素の変化はカラヌス目 *Calanus pacificus* で報告されており、餌料を与えずに *C. pacificus* を飼育した結果、飼育開始2時間後にアスタキサンチン含有量の減少が認められ、餌料の供給を開始すると、24 時間後にはアスタキサンチン含有量が飼育前と比べ最大 1.5 倍まで増加した (Juhl et al. 1996)。しかし、*N. cristatus* を含む *Neocalanus* 属は、主に表層で摂餌を行うことが報告されており (Fulton 1973; Miller et al. 1984; Miller and Clemons 1988; Kobari and Ikeda 1999)、表層から出現した *N. cristatus* C5 が、深層に比べて低い赤色面積率を示した本研究結果と矛盾する (Fig. 30)。本研究と先行研究の結果から、*N. cristatus* C5 の体色変化方法として 2 つの仮説が考えられる。仮説 1 は、*N. cristatus* C5 が他の 2 種に比べ、アスタキサンチン色素を蓄積しやすく、表層に分布している期間は蓄積したアスタキサンチン色素を分解している説である。表層における動物プランクトンでは、体色を持つ個体の被食リスクが、半透明な個体に比べ高いことが報告されている (Hairston 1979a; Morgan and Christy 1996)。表層に分布する *N. cristatus* C5 は、蓄積されるアスタキサンチン色素を分解することで被食リスクを低下させている可能性がある。深層へ移動した *N. cristatus* C5 は休眠に伴い代謝活性が低下することが報告されており (Ikeda et al. 2004)、その結果、アスタキサンチン色素が蓄積し体色に変化していると考えられる。*Neocalanus* 属 3 種の摂食期間である春季~夏季では、*N. cristatus* は他の 2 種より下層に分布し (Mackas et al. 1993; Tsuda et al. 2014)、沈降粒子を主に摂食していると示唆されている (Booth et al. 1993; Dagg 1993)。種間のアスタキサンチン色素蓄積量の差異は、摂餌物の違いによって生じている可能性があり、餌料の量や組成が、カイアシ類の合成するアスタキサンチン色素に影響する可能性は先行研究でも示唆されている (e.g. Van Nieuwerburgh et al. 2005; HOLETON et al. 2009)。しかし、 β -carotene や zeaxanthin などの色素前駆体が、表層に分布する植物プランクトンに比べ、糞粒などによって形成された沈降粒子に多く含まれているとは考え辛い。仮説 2 は、*N. cristatus* C5 は、表層に分布し

ている期間はアスタキサンチン色素合成を行わず、深層へ移動した後に体内に蓄積した色素前駆体を使用して合成をしている説である。摂餌を伴わない半透明から赤色への体色変化は、カラヌス目 *P. norvegica* で報告されており、Vestheim et al. (2005)は、餌料を与えずに暗所で *P. norvegica* を飼育した結果、24 時間後に半透明から赤色へ体色に変化したと報告している。北太平洋亜寒帯域に生息する *Neocalanus* 属 3 種の含有色素に関する知見は存在しないため、仮説の検証を行うには、各種の C5 から色素を抽出し、HPLC (High performance liquid chromatography)を使用することで色素の組成を解析する必要があると考えられる (e.g., Lotocka et al. 2004; Snoeijs and Haubner 2014)

4.4.2. 体色変化による生存戦略

海洋生物における視覚捕食者からの隠蔽戦略は体色変化、反射、鏡面化、カウンターイルミネーション、小型化、透明化などが報告されている。特に小型化と透明化は、海洋環境の多様な光環境下において高い隠蔽性が認められており、有光層では透明な動物プランクトンが優占している (Herring 1994; Johnsen 2001; Johnsen 2003)。しかし、透過率の高い体内に、他の組織と屈折率が異なる部位が存在する場合は、隠蔽効果が大きく低下する可能性が示唆されており、脂質を多く含む組織とキチン質の外殻では光の屈折率が大きく異なるため (Johnsen 2003)、油球を蓄積した個体は、蓄積前とくらべ被食リスクが増加すると考えられる。本研究の結果、*N. cristatus* の赤色面積率は、油球面積率の増加に伴い上昇しており、特に 500 m 以深に分布する個体は高い赤色面積率を示した (Fig. 30a)。赤色は、深層の光環境で視覚捕食者に対して高い隠蔽効果があると考えられるため (Widder et al. 1983; Herring and Roe 1988; Johnsen 2005)、*N. cristatus* C5 は、赤色化することで体内の油球を視覚捕食者から隠蔽している可能性がある。*Neocalanus cristatus* C5 の前体部長は約 7 mm に達するのに対して、他の *Neocalanus* 属 2 種は 4 mm 以下であり、1.5 倍以上大きい (Kobari and Ikeda 1999; Kobari and Ikeda 2001a, b)。魚類などの

視覚捕食者は、より体サイズが大きい餌生物を選食する傾向があり (e.g. De Robertis et al. 2000)、他の 2 種に比べ体サイズが大きい *N. cristatus* は隠蔽性を高め捕食リスクを軽減させていると考えられる。色素蓄積によって動物プランクトンが得る生態学的な利点は、有害波長光からの防御や隠蔽効果の他に、抗酸化作用の活性化や、エネルギー源の蓄積などが挙げられる。アスタキサンチン色素は蓄積することによって、蓄えた脂質の酸化を防ぐ効果もあると示唆されており (Juhl et al. 1996; Lotocka et al. 2004; Sommer et al. 2006)、カラヌス目 *Eurytemora affinis* では、色素を持つ個体は、持たない個体に比べ高い抗酸化能力を示したと報告されている (Gorokhova et al. 2013)。また、動物プランクトンはアスタキサンチン色素をエネルギー源として利用している可能性が示唆されている (Ringelberg 1980; Lotocka et al. 2004)。Ikeda et al. (2004) は、成熟した *N. cristatus* の雄成体は白色を呈し、成熟して体内に卵を持つ雌成体の体色は C5 に比べ淡い赤色を示したと報告している。*Neocalanus cristatus* C5 は、成長と生殖器官発達のために体内の色素をエネルギーとして利用した可能性が考えられる。産卵後のアスタキサンチン色素含有量の減少は、オキアミ類 *Euphausia pacifica* でも報告されている (Funk and Hobson 1991)。

本研究の結果、500 m 以深に分布する生息する *N. cristatus* C5 が、500 m 以浅に分布する個体に比べ高い赤色面積率を示した。また、赤色面積率と油球面積率には、強い正の相関関係が認められた。*Neocalanus cristatus* の C5 は深層でアスタキサンチン色素を合成することで赤色化すると考えられ、視覚捕食者からの油球隠蔽や、酸化防止、成熟のためのエネルギー源として利用している可能性がある。一方、*N. plumchrus* と *N. flemingeri* では、顕著な体色変化は見られず、*Neocalanus* 属 3 種は、異なる体色変化パターンを示した。親潮域に分布する 3 種は、体色変化においても異なる生存戦略を持っていると考えられる。

第5章 総合考察

本研究では、北太平洋亜寒帯域に生息する *Neocalanus* 属カイアシ類 3 種 *N. cristatus*、*N. flemingeri*、*N. plumchrus* を対象として、これまで知見が乏しかった深層における capital breeding 型カイアシ類の生存戦略を解明するため、初期生活史と体色変化について研究を行った。その結果、分子生物学的手法を確立して 3 種の初期生活史を解明し、採集直後に撮影した、画像の解析を行うことで体色変化パターンの解明に成功した。これらの結果から、北太平洋に分布する *Neocalanus* 属カイアシ類 3 種の新たな生態学的知見を蓄積することが出来た。これまでの研究によって、3 種の生活史の違いはすでに報告されていたが、本研究の結果によって、3 種の違いは、さらに顕著だと判明し、異なる生存戦略を持ち同所的に生息していると判明した。下記に、これまでの知見と本研究によって得られた知見から、3 種の生活史の特徴と、その差異について考察する。

5.1. *Neocalanus cristatus* 生活史の特徴

初期生活史における *N. cristatus* と他の 2 種の最大の相違点は卵黄栄養期間の長さであり、N3 に摂餌を開始する *N. plumchrus* や *N. flemingeri* とは異なり、*N. cristatus* は卵黄の栄養のみで初期コペポダイト期まで成長可能である (Saito and Tsuda 2000)。これは、中深層性カイアシ類に見られる特徴であり (Mathews 1964; Lee et al. 1974)、餌の少ない深層環境に適応した生存戦略だと考えられる。本研究の結果、*N. cristatus* のノープリウス幼生は主に 200 m 以深に分布していることが判明した (Figs. 15、16)。可視光線が減衰する 200 m 以深は表層に比べて、視覚捕食者の探餌能力が低下すると考えられる (Aksnes and Giske 1993)。そのため、*N. cristatus* ノープリウス幼生は 200 m 以深に分布することで被食リスクを低下させている可能性が高い。また、*N. cristatus* は摂食せずに C1 に成長することが可能なため (Saito and Tsuda 2000)、N3 以降で探餌を行う他の 2 種に比べ摂餌

行動に伴う振動発生が抑制され、振動を感知し摂餌を行う捕食者（例えば、ヤムシ類）の捕食対象となる可能性が低いと考えられる。一方、コペポダイト期における *Neocalanus cristatus* は、体サイズが他の 2 種に比べて大きく（Saito and Tsuda 2000）、魚類などの視覚捕食者のターゲットにされ易い（e.g. De Robertis et al. 2000）。さらに、コペポダイト期に表層に分布する期間が、他の 2 種に比べて長く（Miller et al. 1984; Kobari and Ikeda 1999; Tsuda et al. 2004）、高い被食リスクを経験している可能性がある。そのため、*N. cristatus* にとって、深層への鉛直移動と、それに伴う赤色化は（Fig. 30a, 32a）、隠蔽効果を得ることで死亡リスクを軽減させる重要な生存戦略の一つだと考えられる。

Machida et al. (2006)は、複数の遺伝子を用いた系統解析を全ての *Neocalanus* 属カイアシ類を対象に行い、*N. cristatus* が *N. plumchrus* と *N. flemingeri* に比べ祖先的な種であると示唆している。同じく、祖先的な系統関係が認められている亜熱帯性の *Neocalanus glacialis* は *N. cristatus* と同じく、体内に油球を持つ C1 が報告されており、ノープリウス幼生は卵黄栄養のみで初期コペポダイト期に成長出来る可能性が示唆されている（Shimode et al. 2009）。*Neocalanus* 属の祖先種は、*N. cristatus* と同じ初期生活史をもっていた可能性が考えられる。

5.2. *Neocalanus flemingeri* 生活史の特徴

Neocalanus flemingeri のノープリウス幼生は、3 種の *Neocalanus* 属の中で、最も表層に分布しており、全ての成長段階が主に 200 m 以浅から出現した（Figs. 19, 20）。200 m 以浅の有光層では、深層に比べ被食リスクが高く、3 種の中ではノープリウス幼生期の死亡率は、*N. flemingeri* が最も高いと考えられる。しかし、有光層内に分布することで、*N. flemingeri* のノープリウス幼生は大規模な鉛直的な移動を行わずに、表層で増殖する春季植物プランクトンを摂餌することが出来る。そのため、短期間のみ持続する植物プランクトン生産の適期を外すことなく利用することが可能だと考えられる。

Neocalanus flemingeri と *N. plumchrus* のノープリウス幼生は、それぞれの孵化深度から 0~50 m に鉛直移動を行う。0~50 m の表層では、冬季から早春にかけて、風による小規模な攪乱が高頻度で起こるため、弱い成層が崩れ植物プランクトンの生産が低下・上昇を繰り返す。また、乱流によりノープリウス幼生と餌粒子の遭遇率が増加する可能性がある (e.g. Rothschild and Osborn 1988)。 *Neocalanus flemingeri* と *N. plumchrus* では、鉛直移動を行うタイミングが異なり (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2000a, b)、本研究の結果、 *N. flemingeri* 後期ノープリウス幼生は 10 月から翌年の 3 月まで 0~50 m に分布し、 *N. plumchrus* は 4 月から N3~6 が同層に分布したので (Figs. 19, 25)、両種の N3~6 ノープリウス幼生が 0~500 m で混在する期間は非常に短いと考えられる。親潮域において、 *N. flemingeri* ノープリウス幼生が主に出現する 1~2 月では、植物プランクトン高生産期 (4~5 月) に比べ、クロロフィル *a* 濃度が低い (Kasai et al. 1997)。北太平洋亜寒帯域では、春季の高生産時期を除き 5 μm 以下の小型植物プランクトンが植物プランクトン炭素量の 2/3 を占めている (Booth 1988; Booth Lewin and Lorenzen 1988)。 *Neocalanus* 属カイアシ類のノープリウス幼生と体サイズに近い *Calanus helgolandicus* のノープリウス幼生を用いた飼育実験では、5 μm 以下の小型植物プランクトンを餌料として与え、C1 までの飼育に成功している (Rey et al. 2001)。5 μm 以下の小型植物プランクトンは、 *N. flemingeri* ノープリウス幼生にとって主要な餌料となっていると考えられる。 *Neocalanus flemingeri* はノープリウス幼生期に、 *N. plumchrus* より早く 50 m 以浅に鉛直移動を行い、コペポダイト期へ成長することによって餌料や生息空間の競合を回避している可能性がある。

5.3. *Neocalanus plumchrus* 生活史の特徴

5.3.1. ノープリウス 3 期における成長停滞について

本研究の結果から *N. plumchrus* は N3 に成長を停滞させ、同期的に鉛直移動を行い後

期ノープリウス幼生に成長することが分かった (Fig. 29)。 *N. plumchrus* は、上層への鉛直移動を N3 に行っており (Fig. 25)、 *N. flemingeri* と共通の特徴が認められた (Figs. 19)。 N3 による鉛直移動は、 *Calanus* 属カイアシ類でも報告されており (Williams et al. 1987; Huang et al. 1992, 1993; Durbin et al. 2000)、鉛直移動を行うカイアシ類ノープリウス幼生に広く共通する特徴だと考えられる。 N3 は遊泳器官である第一触角や、感覚器官である尾部保護装置が N1~2 から大きく発達するため (Koga 1984)、遊泳能力および逃避能力能力は N1~2 に比べ高いと考えられる。また、N3 は体サイズが小さいため、被食リスクが後期ノープリウス幼生に比べて低いと考えられ (e.g. De Robertis et al. 2000)、被食リスクをともなう鉛直移動に適した成長段階だと示唆される。

N3 による成長停滞は、他の *Neocalanus* 属 2 種には認められない特徴であり、この成長停滞機構によって、表層に鉛直移動し同期的に成長するタイミングを調節していると考えられる。ノープリウス幼生期における成長停滞は、海洋の浮遊性カイアシ類では極域に生息するカラヌス目カイアシ類 *Paralobidocera antarctica* (Tanimura et al. 1996) と *Calanus hyperboreus* (Hirche and Niehoff 1996; Melle and Skjoldal 1998) で示唆されている。 *Paralobidocera antarctica* は南極海氷縁域に生息するカイアシ類であり、 *N. plumchrus* や *C. hyperboreus* とは異なりノープリウス幼生期に海氷内に進入し、4~5 カ月間 N4 または N5 で成長を停滞させる (Tanimura et al. 1996)。 *Calanus hyperboreus* は主に、北極海やその周辺海域に分布するカイアシ類であり、 *N. plumchrus* と同様に産卵期が、冬季から翌年の春季まで長期間継続し、初期コペポダイト期は植物プランクトンブルーム期間に伴い表層から出現する (Conover and Huntley 1991; Hirche and Niehoff 1996)。 Hirche and Niehoff (1996) は、Greeland Sea における *C. hyperboreus* の産卵期間と植物プランクトンブルーム期には 6 カ月間以上の差異があり、ノープリウス幼生は長期間、海氷下の乏しい餌環境で生存する必要があると報告している。 Melle and Skjoldal (1998) は、コペポダイト期に加え、ノープリウス幼生の同定を行い、Barents Sea における *C.*

hyperboreus の生活史を報告した。その結果、春季植物プランクトンブルームが起こるまで、後期ノープリウス幼生が出現しなかったと報告している。*Calanus hyperboreus* の主な分布域では、植物プランクトン生産期間が海氷によって制限されており、N3 成長停滞は、季節的に限られた植物プランクトン生産を最大限に利用する生存戦略だと考えられる。

N3 の成長停滞は、個体群動態の研究結果から示唆されたのみであり、成長停滞のメカニズムは不明である。本研究の結果、*N. plumchrus* では 4 月に同期的に成長を再開させており (Fig. 29)、成長停滞状態から覚醒するトリガーが存在すると考えられる。カイアシ類の成長停滞期間である休眠期では、休眠を解除すると考えられるトリガーが複数示唆されている。特に、脂質含有量の変化は、*Calanus* 属カイアシ類の休眠開始と終了に密接に関係していることが、生態学的、分子生物学的、数値モデルを用いた推測などの結果認められ (Miller et al. 1998; Campbell et al. 2004; Tarrant et al. 2008; Map et al. 2010)、休眠中に一定の閾値まで脂質が減少すると、休眠状態から覚醒すると考えられている (Hind et al. 2000; Saumweber and Durbin 2006)。*Neocalanus plumchrus* のノープリウス幼生は、無餌環境下で N3 へ成長し、2 カ月以上の期間、卵黄由来の栄養分を消費しながら生存できることが報告されており (Saito and Tsuda 2000)、栄養分の残存量によって、摂餌を開始して成長を再開させている可能性がある。しかし、同期的な成長再開が認められた 3~4 月における *N. plumchrus* N3 個体群には、10 月から翌年の 4 月に孵化した産卵期間の異なる集団が混在している。また、親個体群には、親潮域に分布する個体以外に周辺海域から流入した集団が含まれている可能性が高い (Shimizu et al. 2009; Tatebe et al. 2010)。これら親個体の分布域、孵化したタイミングが異なる N3 集団が 3~4 月に等しい量の栄養分を持っているとは考えづらく、同期的な行動を起こすには、共通した外部からのトリガーが不可欠であると考えられる。

カイアシ類における休眠状態から覚醒する外部からのトリガーとして、季節的な日照時間の変化が報告されており、カラヌス目 *C. finmarchicus* は日照時間の変化を感知して、同

期的に休眠から覚醒すると示唆されている (Miller et al. 1991; Speirs et al. 2005)。しかし、*N. plumchrus* の N3 は主に有光層以深に分布しているため、日照時間の変化を感知することが困難である。また、同じ緯度帯においても沿岸域と外洋域でコペポダイトの出現期間が大きく異なることも報告されており (Fulton 1973; Mackas et al. 1998; Batten and Mackas 2009; Mackas et al. 2012)、日照時間がトリガーとは考えられない。さらに、深層環境は表層に比べ水温や塩分などの変動が乏しいため (Fig. 11)、これらの環境変化が直接的なトリガーとなる可能性は低いと考えられる。本研究結果において、N3 の成長再開とも同期的に大きく変化した環境要因はクロロフィル *a* 濃度であり (Fig. 11)、N3 は春季の植物プランクトン高生産期由来の生産物によって成長を再開させた可能性が考えられる。しかし、大規模な植物プランクトンブルームは親潮域や一部の沿岸域でのみ発生する現象であり、HNLC 海域を含む外洋域では顕著なクロロフィル *a* 濃度の増加は見られない (Parsons and Anderson 1970; Welschmeyer et al. 1993)。また、親潮域と HNLC 海域にそれぞれ生息する *N. plumchrus* の生活史は、ほぼ同じ季節性を持つと報告されており (Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2001b)、植物プランクトンブルームの有無では、同期的な行動の説明はできない。

成長停滞解除の直接的なトリガーを特定できれば、それが発生するタイミングや規模を知ることによって *N. plumchrus* の C1 発生期間の予測が可能になる。また、成長停滞解除のタイミング変化は *N. plumchrus* 生活史の季節性変化の原因である可能性が高く、生活史の季節性変動のメカニズム解明の糸口となりえる。しかし、本研究結果からは、N3 の成長再開の直接的なトリガーを特定できなかった。N3 の成長再開は、内的要因 (e.g. 脂質含有量) や外的要因 (e.g. 水温変化、沈降物の増減) を含む複数要因の組み合わせによって誘因されている可能性が高く、直接的な誘因要因特定の妨げとなっていると考え得られる。

成長再開に伴い、N3 は代謝機能の活性化、運動機能の上昇、または、脱皮の準備などを行うために特定のタンパク質を体内で合成している可能性がある。このような生理的な

変化は、体内の発現遺伝子 (mRNA) を研究することで解析を行うことが可能であり、*C. finmarchicus* では、C5 を用いて発現遺伝子を網羅的に解析し、C6 への脱皮に伴い発現量が増加する遺伝子の特定に成功している (Tarrant et al. 2014)。また、休眠期間中に採集した *C. finmarchicus* を用いて、遺伝子の発現量を定量的に解析し、休眠中に発現量が増加する遺伝子が複数報告されている (Tarrant et al. 2008)。*Neocalanus plumchrus* の N3 を用いて発現遺伝子の解析を行うことで、成長停滞中に発現量が増加する遺伝子を特定し、その発現量を指標とすることで、成長再開までの時期を予測できると考えられる。また、発現量の変化と同期的に変化する環境要因を特定することで、成長再開に直接的に影響を与える環境要因を特定できる可能性がある。

5.3.2. *Neocalanus plumchrus* ノープリウス幼生期間の餌環境

Neocalanus plumchrus ノープリウス幼生が表層に移動するタイミングは、3 種の *Neocalanus* 属の中で最も遅く、本研究では、春季植物プランクトン高生産期が始まる 4 月から表層に出現した (Figs. 25, 29)。また、*N. cristatus* ノープリウス幼生は摂餌を行わず、*N. flemingeri* ノープリウス幼生は 4 月に出現しなかったため、*N. plumchrus* は親潮域で唯一、ノープリウス幼生期に春季植物プランクトン高生産時期を利用してコペポダイト期に成長する *Neocalanus* 属カイアシ類だと考えられる。

親潮域では、春季植物プランクトン高生産時期の際に珪藻類の大規模な増殖が起こる (Saito et al. 2002; Liu et al. 2004; Suzuki et al. 2011)。珪藻類は、植食性カイアシ類の主要な摂餌対象だと考えられ、飼育実験においても広く使用されている餌料である。しかし、ノープリウス幼生期とコペポダイト期は、好適な餌のサイズ範囲が異なると示唆されており (Harris 1996; Richardson and Verheye 1999)、植物プランクトン高生産期中に増殖する珪藻がノープリウス幼生にとって好適な餌料であるとは断定できない。コペポダイト期における *Neocalanus* spp. は、下顎の咀嚼器を用いて大型の珪藻類をかみ砕くことが可能で

あり、主に 20 μm 以上の餌を摂餌すると報告されている (Liu et al. 2008)。ノープリウス幼生では、カラヌス目 *C. pacificus* ノープリウス幼生を用いた飼育実験で、大顎の咀嚼器によって餌料をかみ砕くことが可能だと示唆されている (Fernández 1979)。しかし、ノープリウス幼生は消化管に直結する口器の上下に唇状部を備えており、Fernández (1979)は、この間隔によって摂餌出来る餌粒サイズの上限が決定されていると報告している。N3 における *C. pacificus* では、唇状部の間隔は約 44 μm であり、これ以上の餌は効率的に摂餌できないと考えられる。*Calanus pacificus* ノープリウス幼生と体サイズが近い、*N. plumchrus* と *N. flemingeri* ノープリウス幼生においても、44 μm 以上の餌は餌料として利用が困難な可能性が高い。北太平洋において、春季植物プランクトン高生産時期に増殖する主要な植物プランクトン *Chaetoceros* 属、*Thalassiosira* 属は連鎖型珪藻類であり、特に体サイズが後期幼生に比べ小さい N3 は、これらの珪藻類を口器の構造上、効率的に摂餌出来ないと考えられる。

ノープリウス幼生が利用できる珪藻類以外の餌生物として、繊毛虫類などの微小動物プランクトンがあげられる。繊毛虫類は北太平洋では 150 m 以浅に主に分布し (Storm 1993; Sohrin et al. 2010)、親潮域では、クロロフィル *a* 濃度が高い環境で増殖する傾向が示唆されており (Suziki and Taniguchi 1998)、植物プランクトンの増殖に伴い、繊毛虫の細胞数密度が増加すると報告されている (Gómez 2007)。北太平洋に分布する主な繊毛虫は約 10~40 μm であり (Storm 1993; Sohrin et al. 2010)、ノープリウス幼生にとって、珪藻類より摂餌効率が良く、主要な餌資源となっている可能性がある。また、4 月における親潮域の 50 m 以浅では *N. flemingeri* や *E. bungii* などの雑食、植食性カイアシ類のコペポダイト期が分布しており、彼らは *N. plumchrus* のノープリウス幼生にとって捕食者となる反面、大型珪藻類を摂餌し、かみ砕いた咀嚼産物はノープリウス幼生にとって重要な餌資源となる可能性がある。さらに、コペポダイト期が大型の珪藻類や、小型植物プランクトンの捕食者となる小型動物プランクトンを摂餌することで、間接的にノープリウス幼生が効率的

に摂餌出来る小型藻類が卓越する餌環境を形成する可能性も考えられる (Liu et al. 2005; Dagg et al. 2006, 2009)。

5.3.3. *Neocalanus plumchrus* 生活史の特異性

鉛直移動や休眠行動による成長のタイミング調節機構は、カイアシ類にとって重要な生存戦略の一つであり、種内で同期的に成長することによって、成熟するタイミングを合わせ、生殖行動の成功率上昇などの利点を得られる。そのため、成長のタイミング調節機構は、分布範囲が広く、同種の遭遇率が低い外洋性種にとって特に重要な生存戦略だと言える。これまでの研究報告と、本研究の結果から、*N. plumchrus* は *N. cristatus*、*N. flemingeri* とは異なる成長のタイミング調節機構を持つと考えられる。

Neocalanus cristatus と *N. flemingeri* は、それぞれ C5、雌成体に休眠した後、種内で、一部の個体群を除き同期的に覚醒し産卵を始めることで成長のタイミングを調節していると考えられる。一方で、*N. plumchrus* の産卵は、*N. cristatus* や *N. flemingeri* に比べ顕著な産卵のピークが存在せず、産卵中の雌成体が、一定の割合で 10 月から翌年の 4 月まで出現する (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2001b)。また、産卵期間中に休眠中と考えられる C5 が出現しており、*N. plumchrus* が同期的に休眠・脱休眠を行い、産卵を行っているとは考えづらい (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999; Kobari and Ikeda 2001)。しかし、本研究の結果、*N. plumchrus* は N3 で成長を停滞させ、同期的に表層へ移動することで成長のタイミングを調節し成長していると示唆された。*Neocalanus plumchrus* 生活史の利点として、まず、N3 に同期的な鉛直移動を行うことで、初期コペポダイト幼生期の被食リスクを軽減させる効果があると考えられる。また、初期コペポダイト期においても、安定した環境下で成長と脂質蓄積を迅速に行い、深層に移動することで、被食リスクの高い表層に滞在する期間を短縮させている可能性がある。残念ながら、本研究では、N3 の成長を再開させる、直接的なトリガーの特定にはいた

らなかった。しかし、これら成長停滞機構の違いが、共通の環境変化に対して、*N. plumchrus* のみが他の 2 種とは異なる生活史パターンの変化 (Chiba et al. 2006)を示した要因の一つだと考えられる。また、*N. plumchrus* が、他の 2 種に比べ高い現存量を維持し、北太平洋亜寒帯域において、最も成功した優占動物プランクトンであることから (Miller and Clemons 1988; Tsuda et al. 1999, 2015; Kobari and Ikeda 1999, 2001a, b)、ノープリウス幼生期における成長調節機構は、北太平洋亜寒帯域の環境に適した生存戦略だと示唆される。

5.5. まとめ

本研究によって capital breeding 型カイアシ類である、北太平洋亜寒帯域に生息する 3 種の *Neocalanus* 属カイアシ類の新たな生態学的知見を蓄積することができた。本研究の結果、深層における 3 種の生活史と生存戦略は大きく異なり、初期生活史には明瞭な差異が認められ、*N. cristatus* C5 のみ鉛直移動に伴い体色を変化させていることが判明した。これらの結果から、3 種は深層環境を異なる方法で利用することで同所的に分布していることが強く示唆された。Table 9 に 3 種 4 個体群の初期生活史の特徴をまとめた。また、研究過程で、他のノープリウス幼生同定に応用できる、real-time PCR を用いた種同定方法の確立に成功した。

近年では、本研究を含め、分子生物学的手法を用いた系統解析、トランスクリプトームを通じた生化学的な研究や、安定同位体を用いた食物網における栄養段階の推定、消化管内容物の解析など、これまでカイアシ類に用いられなかった、新たな手法を使った生態学的研究が行われ、新たな知見が得られている (e.g. Bucklin et al. 1999; Tarrant et al. 2008, 2014; Chiba et al. 2012; Sano et al. 2013)。動物プランクトンの生態学的な研究は、微生物や植物プランクトンに比べ、解析方法の進歩が乏しく、未だに形態情報を用いた分類同定が主流だった。今後は、新たな解析方法を用いて、生態学的な知見を蓄積し、動物プラン

クトンの生態学的研究を更に進展させていくつもりである。

Table 9. Timing of early life history for *Neocalanus* spp. in the Oyashio region.

	Main spawning season	Distribution depth of nauplius	Upward vertical migration	Stop development
<i>N. cristatus</i>	Before October - December	Below 200 m	N1-6 and C1	Not observed
<i>N. flemingeri</i> (small form)	January - February	0 - 200 m	Egg or N1-2 and N3	Not observed
<i>N. flemingeri</i> (large form)	January - March	0 - 500 m	Uncertain	Uncertain
<i>N. plumchrus</i>	October - May	0 - 2000 m	C6 female and N3	N3

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜った東京大学大気海洋研究所浮遊生物分野研究室津田敦教授に心から御礼申し上げます。また、同研究所、齊藤宏明准教授、国際連携研究センター西田周平教授、環境動態分野研究室伊藤進一教授、東京大学農学研究科水圏生物環境学研究室高橋一生准教授には数多くの助言と本論に対する校閲を頂きました。謹んで感謝の意を表します。また、東海大学海洋学部海洋生物学科西川淳教授には研究を進めるにあたり多くのご助言をいただきました。

独立行政法人水産総合センター北海道区水産研究所生産環境部生産変動グループ、小埜恒夫研究員（現・中央区水産研究所）、葛西広海研究員、黒田寛研究員、東北区水産研究所資源海洋部生態系動態グループ、桑田晃グループ長、田所和明研究員、には動物プランクトン試料採集に多大なる援助を賜り、海洋観測データを提供していただき、さらに、北太平洋亜寒帯域の生態系を研究する上で貴重な御助言をいただきました。

試料を採集するにあたり全面的協力をいただいた独立行政法人水産総合センター北海道区水産研究所北光丸、東北区水産研究所若鷹丸の船長、士官ならびに乗組員の方々に感謝の意を表します。また、厳しい外洋での観測において、船上での苦楽を共にした多くの大学院生、水産研究所の研究者の方々に厚くお礼申し上げます。

ルイジアナ大学海洋コンソーシア、Michael J. Dagg 博士には *Neocalanus* 属カイアシ類の生活史関する貴重な御助言をいただきました。

台湾中央研究院、町田龍二博士、独立行政法人水産総合センター東北区水産研究所、宮本洋臣博士におかれましては実験方法、データ解析方法など親切丁寧に教えて頂きました。

研究室での研究生活において、平井淳也博士（現・中央区水産研究所）には研究生活を通してご助力いただきました。東京大学大気海洋研究所附属国際連携研究センター、佐野雅美博士、守屋光奏氏には先輩として様々な御助言をいただき、研究を行う上での考え方

に大きな影響を受けました。また、研究生活の中で常に暖かい励ましと御協力をいただき、大学院生活を有意義なものにしていただきました東京大学大気海洋研究所浮遊生物分野研究室の皆様、研究を通じて知り合うことのできた多くの研究者に心から感謝の意を表します。

最後に、研究を遂行するにあたり十分な体力と生活費、全てにおよび快適な環境を提供していただいた、親愛なる両親に心から感謝します。

7. 引用文献

- Abràmoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11, 36-42.
- Aksnes, D.L., Giske, J., 1993. A theoretical model of aquatic visual feeding. *Ecological Modelling* 67, 233-250.
- Amcoff, P., Börjesson, H., Eriksson, P., Norrgren, L., 1998. Effects of thiamine treatments on survival of M74-affected feral Baltic salmon. *American Fisheries Society Symposium* 21, 31-40.
- André, C., Lindegarth, M., Jonsson, P.R., Sundberg, P., 1999. Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD); differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 79, 563-565.
- Banse, K., English, D.C., 1999. Comparing phytoplankton seasonality in the eastern and western subarctic Pacific and the western Bering Sea. *Progress in Oceanography* 43, 235-288.
- Basedow, S.L., Tande, K.S., 2006. Cannibalism of female *Calanus finmarchicus* on naupliar stages. *Marine Ecology Progress Series* 327, 247-255.
- Batten, S.D., Mackas, D.V., 2009. Shortened duration of the annual *Neocalanus plumchrus* biomass peak in the northeast Pacific. *Marine Ecology Progress Series* 393, 189-198.
- Beamish, R.J., Neville, C.E., Cass, A.J., 1997. Production of Fraser River sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in relation to decadal-scale changes in the climate and the ocean. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 543-554.

- Beaugrand, G., Brander, K.M., Lindley, J.A., Souissi, S., Reid, P.C., 2003. Plankton effect on cod recruitment in the North Sea. *Nature* 426, 661-664.
- Bertram, D.F., Mackas, D.L., McKinnell, S.M., 2001. The seasonal cycle revisited: Interannual variation and ecosystem consequences. *Progress in Oceanography* 49, 283-307.
- Bonnet, D., Harris, R.P., Yebra, L., Guilhaumon, E., Conway, D.V.P., Hirst, A.G., 2009. Temperature effects on *Calanus helgolandicus* (Copepoda: Calanoida) development time and egg production. *Journal of Plankton Research* 31, 31-44.
- Bonnet, D., Titelman, J., Harris, R., 2004. *Calanus* the cannibal. *Journal of Plankton Research* 26, 937-948.
- Booth, B.C., 1988. Size classes and major taxonomic groups of phytoplankton at two locations in the subarctic Pacific Ocean in May and August 1984. *Marine Biology* 97, 275-286.
- Booth, B.C., Lewin, J., Lorenzen, C.J., 1988. Spring and summer growth rates of subarctic Pacific phytoplankton assemblages determined from carbon uptake and cell volumes estimated using epifluorescence microscopy. *Marine Biology* 98, 287-298.
- Booth, B.C., Lewin, J., Postel, R., 1993. Temporal variation in the structure of autotrophic and heterotrophic communities in the subarctic Pacific. *Progress in Oceanography* 32, 57-99.
- Bradley, C.J., Strickler, J.R., Buskey, E.J., Lenz P.H., 2013. Swimming and escape behavior in two species of calanoid copepods from nauplius to adult. *Journal of Plankton Research* 35, 49-65.
- Britton, G., Weesie, R.J., Askin, D., Warburton, J.D., Gallardo-Guerrero, L., Jansen, F.J.,

- de Groot, J.M., Lugtenburg, J., Cornard, J., Merlin, J., 1997. Carotenoid blues: Structural studies on carotenoproteins. *Pure and Applied Chemistry* 69, 2075-2084.
- Brooms, C., Melle, W., 2007. Seasonal development of *Calanus finmarchicus* in relation to phytoplankton bloom dynamics in the Norwegian Sea. *Deep-Sea Research Part II* 54, 2760-2775.
- Brown, P.O., and Botstein, D., 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics* 21, 33-37.
- Bucklin, A., Astthorsson, O.S., Gislason, A., Allen, L.D., Smolenack, S.B., Wiebe, P.H., 2000. Population genetic variation of *Calanus finmarchicus* in Icelandic waters: preliminary evidence of genetic differences between Atlantic and Arctic populations. *ICES Journal of Marine Science* 57, 1592-1604.
- Bucklin, A., Guarnieri, M., Hill, R.S., Bentley, A.M., Kaartvedt, S., 1999. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. *Hydrobiologia* 401, 239-254.
- Bucklin, A., Hopcroft, R.R., Kosobokova, K.N., Nigro, L.M., Ortman, B.D., Jennings, R.M., Sweetman, C.J., 2010. DNA barcoding of Arctic Ocean holozooplankton for species identification and recognition. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 57, 40-48.
- Bucklin, A., Steinke, D., Blanco-Bercial, L., 2011. DNA barcoding of marine Metazoa. *Annual Review of Marine Science* 3, 471-508.
- Byron, E.R., 1982. The adaptive significance of Calanoid copepod pigmentation: a comparative and experimental analysis. *Ecology* 63, 1871-1886.
- Campbell, M.H., 1934. The life history and post embryonic development of the copepods *Calanus tonsus* Brady and *Euchaeta japonica* Marukawa. *Journal of the Biological*

- Board of Canada 1, 1-65.
- Campbell, R.G., Runge, J.A., Durbin, E.G., 2001. Evidence for food limitation of *Calanus finmarchicus* production rates on the southern flank of Georges Bank during April 1997. *Deep-Sea Research II* 48, 531-549.
- Campbell R.W., Boutillier, P., Dower, J.F., 2004. Ecophysiology of overwintering in the copepod *Neocalanus plumchrus*: changes in lipid and protein contents over a seasonal cycle. *Marine Ecology Progress Series* 280, 211-226.
- Chiba, S., Aita, M.N., Tadokoro, K., Saino, T., Sugisaki, H., Nakata, K., 2008. From climate regime shifts to lower-trophic level phenology: Synthesis of recent progress in retrospective studies of the western North Pacific. *Progress in Oceanography* 77, 112-126.
- Chiba, S., Ono, T., Tadokoro, K., Midorikawa, T., Saino, T., 2004. Increased stratification and decreased lower trophic level productivity in the Oyashio region of the North Pacific: a 30-year retrospective study. *Journal of Oceanography* 60, 149-162.
- Chiba, S., Sugisaki, H., Kuwata, A., Tadokoro, K., Kobari, T., Yamaguchi, A., Mackas, D.V., 2012. Pan-North Pacific comparison of long-term variation in *Neocalanus* copepods based on stable isotope analysis. *Progress in Oceanography* 97-100, 63-75.
- Chiba, S., Tadokoro, K., Sugisaki, H., Saino, T., 2006. Effects of decadal climate change on zooplankton over the last 50 years in the western subarctic North Pacific. *Global Change Biology* 12, 907-920.
- Coffroth, M.A., Mulawka, J.M., 1995. Identification of marine invertebrate by means of PCR-RAPD species-specific markers. *Limnology and Oceanography* 40, 181-189.
- Conover, R.J., 1967. Reproductive cycle, early development, and fecundity in Laboratory Populations of the copepod *Calanus Hyperboreus* 1). *Crustaceana* 13, 61-72.

- Conover, R.J., 1988. Comparative life histories in the genera *Calanus* and *Neocalanus* in high latitudes of northern hemisphere. *Hydrobiologia* 167-168, 127-142.
- Conover, R.J., Huntley, M., 1991. Copepods in ice-covered seas-distribution, adaptations to seasonally limited food, metabolism, growth patterns and life cycle strategies in polar seas. *Journal of Marine Systems* 2, 1-41.
- Cook, K.B., Bunker, A., Hay, S., Hirst, A.G., Speirs, D.G., 2007. Naupliar development times and survival of the copepods *Calanus helgolandicus* and *Calanus finmarchicus* in relation to food and temperature. *Journal of Plankton Research* 29, 757-767.
- Cushing, D.H., 1984. The gadoid outburst in the North Sea. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 41, 159-166.
- Czczuga, B., 1960. Haemoglobin content of the larvae of *Tendipes* f.l. *plumosus* L. from various levels of bed sediment. *Nature* 186, 484.
- Czczuga, B., Czerpak, R., 1966. Carotenoids in certain Diaptomidae (Crustacea). *Comparative Biochemistry and Physiology* 17, 523-534.
- Daase, M., Falk-Petersen, S., Varp, Ø., Darnis, G., Soreide, J.E., Wold, A., Leu, E., Berge, J., Philippe, B., Fortier, L., 2013. Timing of reproductive events in the marine copepod *Calanus glacialis*: a pan-Arctic perspective. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 70, 871-884.
- Dagg, M.J., 1993. Sinking particles as a possible source of nutrition for large calanoid copepod *Neocalanus cristatus* in the subarctic Pacific Ocean. *Deep-Sea Research I* 40, 1431-1445.
- Dagg, M.J., Liu, H., Thomas, A.C., 2006. Effects of mesoscale phytoplankton variability on the copepods *Neocalanus flemingeri* and *N. plumchrus* in the coastal Gulf of Alaska. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 53, 321-332.

- Dagg, M.J., Strom, S., Liu, H., 2009. High feeding rates on large particles by *Neocalanus flemingeri* and *N. plumchrus*, and consequences for phytoplankton community structure in the subarctic Pacific Ocean. *Deep-sea Reserch I* 56, 716-726.
- Dahms, H.U., 1995. Dormancy in the copepod an overview. *Hydrobiologia* 306, 199-211.
- Dahms, H.U., Qian, P.Y., 2004. Life histories of the Harpacticoida (Copepoda, Crustacea): A comparison with meiofauna and macrofauna. *Journal of Natural History* 38, 1725-1734.
- Deagle, B.E., Bax, N., Hewitt, C.L., Patil, J.G., 2003. Development and evaluation of a PCR-based test for detection of *Asterias* (Echinodermata: Asteroidea) larvae in Australian plankton samples from ballast water. *Marine and Freshwater Research* 54, 709-719.
- De Robertis, A., Jules, S.J., Ohman, M.D., 2000. Size-dependent visual predation risk and the timing of vertical migration in zooplankton. *Limnology and Oceanography* 45, 1838-1844.
- Durbin, E.G., Garrahan, P.R., Casas, M.C., 2000. Depth distribution of *Calanus finmarchicus* nauplii on the Georges Bank during 1995 and 1996. *ICES Journal of Marine Science* 57, 1686-1693.
- Ebbesmeyer, C.C., Cayan, D.R., McLain, D.R., Nichols, F.H., Peterson, D.H., Redmond, K.T., 1991. 1976 step in the Pacific climate: forty environmental changes between 1968-1975 and 1977-1984. In J. L. Betancourt, V. L. Tharp (eds.), *Proceedings of the 7th Annual Pacific Climate (PACLIM) Workshop*, April 1990 Vol. 26, 115-126, California Department of Water Reserch Interagency Ecology Studies Program Technical Report.
- Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G., 1997. The carotenoids as anti-oxidants – a

- review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41, 189-200.
- Eiane, K., Aksnes, D.L., Ohman, M.D., Wood, S., Martinussen, M.B., 2002. Stage-specific mortality of *Calanus* spp. under different predation regimes. *Limnology and Oceanography* 47, 636-645.
- Eiane, K., Ohman, M.D., 2004. Stage-specific mortality of *Calanus finmarchicus*, *Pseudocalanus elongatus* and *Oithona similis* on Fladen Ground, North Sea, during a spring bloom. *Marine Ecology Progress Series* 268, 183-193.
- Ellertsen, E., Fossum, P., Solemdal, P., Sundby, S., Tilseth, S., 1987. The effect of biological and physical factors on the survival of Arcto-Norwegian cod and the influence on recruitment variability. In H. Loeng, (eds.), *The Effect of Oceanographic Conditions on Distribution and Population Dynamics of Commercial Fish Stocks in the Barents Sea*, 101-126, Institute of Marine research, Bergen.
- Enright, J.T., 1977. Diurnal vertical migration: Adaptive significance and timing. Part 1. Selective advantage: A metabolic model. *Limnology and Oceanography* 22, 856-872.
- Falk-Petersen, S., Mayzaud, P., Kattner, G., Sargent, J.R., 2009. Lipids and life strategy of arctic *Calanus*. *Marine Biology Research* 5, 18-39.
- Fernández, F., 1979. Nutrition studies in the nauplius larva of *Calanus pacificus* (Copepoda: Calanoida). *Marine Biology* 53, 131-147.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294-299.
- Fox, C.J., Taylor, M.I., Pereyra, P., Villasana, M.I., Rico, C., 2005. TaqMan DNA technology confirms likely overestimation of cod (*Gadus morhua* L.) egg abundance in the Irish Sea: implications for the assessment of the cod stock and mapping of

- spawning areas using egg-based methods. *Molecular Ecology* 14, 879-884.
- Foxton, P., 1970. The vertical distribution of pelagic decapods (Crustacea: Natantia) collected on the SOND Cruise 1965 I. The Caridea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 50, 939-960.
- Fryer, G., 1987. Quantitative and qualitative: number and reality in the study of living organisms. *Freshwater Biology* 17, 177-189.
- Fulton, J., 1973. Some aspects of the life history of *Calanus plumchrus* in the Strait of Georgia. *Journal Fisheries Research Board of Canada* 30, 811-815.
- Funk, A.V., Hobson, L.A., 1991. Temporal variations in the carotenoid composition and content of *Euphausia pacifica* Hansen in Saanich Inlet, British Columbia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 148, 93-104.
- Gaonkar, C.C., Khandeparker, L., Desai, D.V., Anil, A.C., 2015. Identification of *Balanus Amphitrite* larvae from field zooplankton using species-specific primers. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 95, 497-502.
- Gasol, J.M., del Giorgio, P.A., 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Science Marine* 64, 197-224.
- Gemmell, B., Buskey, E.J., 2011. The transition from nauplii to copepodites: susceptibility of developing copepods to fish predators. *Journal of Plankton Research* 33, 1773-1777.
- Gifford, D.J., 1993. Protozoa in the diets of *Neocalanus* spp. in the oceanic subarctic Pacific Ocean. *Progress in Oceanography* 32, 223-237.
- Gómez, F., 2007. Trends on the distribution of ciliates in the open Pacific Ocean. *Acta Oecologica* 32, 188-202.

- Goodwin, T.W., 1986. Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. Annual Review of Nutrition 6, 273-297.
- Gorokhova, E., Lehtiniemi, M., Motwani, N.H., 2013. Trade-offs between predation risk and growth benefits in the copepod *Eurytemora affinis* with contrasting pigmentation. PLoS ONE 8, e71385.
- Grabbert, S., Renz, J., Hirche, H.J., Bucklin, A., 2010. Species-specific PCR discrimination of species of the calanoid copepod *Pseudocalanus*, *P. acuspes* and *P. elongates*, in the Baltic and North Seas. Hydrobiologia 652, 289-297.
- Grover, J.J., Olla, B.L., 1987. Effects of an El Nino event on the food habits of larval sablefish, *Anoplopoma fimbria*, of Oregon and Washington. Fishery Bulletin 85, 71-79.
- Hairston, N.G., 1976. Photoprotection by carotenoid pigments in the copepod *Diaptomus nevadensis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 73, 971-974.
- Hairston, N.G., 1979a. The adaptive significance of color polymorphism in two species of *Diaptomus* (Copepoda). Limnology and Oceanography 24, 15-37.
- Hairston, N.G., 1979b. The relationship between pigmentation and reproduction in two species of *Diaptomus* (Copepoda). Limnology and Oceanography 24, 38-44.
- Hairston, N.G., 1981. The interaction of salinity, predators, light and copepod color. Hydrobiologia 81, 151-158.
- Hallberg, E., Hirche, H.J., 1980. Differentiation of the midgut in adults and over-wintering copepods of *Calanus finmarchicus* (Gunnerus) and *C. helgolandicus* Claus. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 48, 283-295.
- Hansson, L.A., 2000. Induced pigmentation in zooplankton: a trade-off between threats

- from predation and ultraviolet radiation. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 267, 2327-2331.
- Hansson, L.A., 2004. Plasticity in pigmentation induced by conflicting threats from predation and UV radiation. *Ecology* 85, 1005-1016.
- Harrison, P.J., Whitney, F.A., Tsuda, A., Saito, H., Tadokoro, K., 2004. Nutrient and plankton dynamics in the NE and NW gyres of the subarctic Pacific Ocean. *Journal of Oceanography* 60, 93-117.
- Hare, S.R., Mantua, N.J., 2000. Empirical evidence for North Pacific regime shifts in 1977 and 1989. *Progress in Oceanography* 47, 103-145.
- Harris, R.P., 1996. Feeding ecology of *Calanus*. *Ophelia* 44, 85-109.
- Hart, R.C., 1990. Copepod post-embryonic durations: pattern, conformity, and predictability. The realities of isochronal and equiproportional development, and trends in the copepodid-naupliar duration ratio. *Hydrobiologia* 206, 175-206.
- Harvey, A.W., Martin, J.W., Wetzer, R., 2001. Phylum Arthropoda: Crustacea. In C. Young, M. Sewell, M. Rice. R., (eds.), *Atlas of Marine Invertebrate Larvae*, 337-369. London: Academic Press.
- Hay, G.C., 2003. A review of the adaptive significance and ecosystem consequences of zooplankton diel vertical migration. *Hydrobiologia* 503, 163-170.
- Hay, G.C., Proctor, C.A., John, A.W.G., Warner, A.J., 1994. Interspecific differences in diel vertical migration of marine copepods: the implications of size, colour and morphology. *Limnology and Oceanography* 39, 1621-1629.
- Head, E.J.H., Melle, W., Pepin, P., Bagøeien, E., Broms, C., 2013. On the ecology of *Calanus finmarchicus* in the sub-arctic North Atlantic: a comparison of population dynamics and environmental conditions in areas of the Labrador

- Sea-Labrador/Newfoundland shelf and Norwegian Sea Atlantic and Coast waters. Progress in Oceanography 114, 46-63.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit I divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences (Suppl.), S96-S99.
- Heinrich, A.K., 1962. The life histories of plankton animals and seasonal cycles of plankton communities in the oceans. Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer 27, 15-24.
- Henzler, C.M., Hoaglund, E.A., Gaines, S.D., 2010. FISH-CS-a rapid method for counting and sorting species of marine zooplankton. Marine Ecology Progress Series 410, 1-11.
- Herring, P.J., 1967. The pigments of plankton at the sea surface. Symposia of the Zoological Society of London 19, 215-235.
- Herring, P.J., 1973. Depth distribution of carotenoid pigments and lipids of some oceanic animals. 2. Decapod crustaceans. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 53, 539-562.
- Herring, P.J., 1983. The spectral characteristics of luminous marine organisms. Proceedings of the Royal Society of London B 220, 183-217.
- Herring, P.J., 1994. Reflective systems in aquatic animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 109, 513-546.
- Herring, P.J., Roe, H.S.J., 1988. The photoecology of pelagic oceanic decapods. Symposia of the Zoological Society of London. 59, 263-290.
- Hill, R.S., Allen, L.D., Bucklin, A., 2001. Multiplexed species-specific PCR protocol to discriminate four N. Atlantic *Calanus* species, with an mtCOI gene tree for ten

- Calanus* species. Marine Biology 139, 279-287.
- Hind, A., Gurney, W.S.C., Heath, M., Bryant, A.D., 2000. Overwintering strategies in *Calanus finmarchicus*. Marine Ecology Progress series 193, 95-107.
- Hipfner, J.M., 2008. Matches and mismatches: ocean climate, prey phenology and breeding success in a zooplanktivorous seabird. Marine Ecology Progress Series 368, 295-304.
- Hirakawa, K., Goto, T., Hirai, M., 1997. Diet Composition and Prey Size of Larval Anchovy, *Engraulis japonicas*, in Toyama Bay, Southern Japan Sea. Bulletin of the Japan Sea National Fisheries Research Institute 47, 67-78.
- Hirche, H.J., 1983. Overwintering of *Calanus finmarchicus* and *Calanus helgolandicus*. Marine Ecology Progress Series 11, 281-290.
- Hirche, H.J., 1996. Diapause in the marine copepod, *Calanus finmarchicus* – a review. Ophelia 44, 129-143.
- Hirche, H.J., 1997. Life cycle of copepod *Calanus hyperboreus* in the Greenland Sea. Marine Biology 128, 607-618.
- Hirche, H.J., 1998. Dormancy in three *Calanus* species (*C. finmarchicus*, *C. glacialis* and *C. hyperboreus*) from the North Atlantic. Archiv fur Hydrobiologie. Special Issues Advances in Limnology 52, 359-369.
- Hirche, H.J., Niehoff, B., 1996. Reproduction of the arctic copepod *Calanus hyperboreus* in the Greenland Sea-field and laboratory observations. Polar Biology 16, 209-219.
- Hirst, A.G., Bonnet, D., Harris, R.P., 2007. Seasonal dynamics and mortality rates of *Calanus helgolandicus* over two years at a station in the English Channel. Marine Ecology Progress Series 340, 189-205.
- Holeton, C., Lindell, K., Holmborn, T., Hogfors, H., Gorokhova, E., 2009. Decreased

- astaxanthin at high feeding rates in the calanoida copepod *Acartia bifilosa*. Journal of Plankton Research 0, 1-8.
- Holmborn, T., Goetze, E., Pöllupüü, M., Pöllumäe, A., 2011. Genetic species identification and low genetic diversity in *Pseudocalanus acuspes* of the Baltic Sea. Journal of Plankton Research 33, 507-515.
- Huang, C., Uye, S., Onbé, T., 1992. Ontogenetic diel vertical migration of the planktonic copepod *Calanus sinicus* in the Inland Sea of Japan II Late fall and early spring. Marine Biology 113, 391-400.
- Huang, C., Uye, S., Onbé, T., 1993. Ontogenetic diel vertical migration of the planktonic copepod *Calanus sinicus* in the Inland Sea of Japan III. Early summer and overall seasonal pattern. Marine Biology 117, 289-299.
- Hygum, B.H., Rey, C., Hansen, B.W., 2000. Growth and development rates of *Calanus finmarchicus* nauplii during and diatom spring bloom. Marine Biology 136, 1075-1085.
- Hylander, S., Boeing, W.J., Granéli, W., Karlsoon, J., von Einem, J., Gutseit, K., Hansson, L.A., 2009. Complementary UV protective compounds in zooplankton. Limnology and Oceanography 54, 1883-1983.
- Hylander, S., Hansson, L.A., 2013. Vertical distribution and pigmentation of antarctic zooplankton determined by a blend of UV radiation, predation and food availability. Aquatic Ecology 47, 467-480.
- Ikeda, T., Hirakawa, K., 1996. The early development and estimated life cycle of the mesopelagic copepod *Pareuchaeta elongate* in the southern Japan Sea. Marine Biology 126, 261-270.
- Ikeda, T., Sano, F., Yamaguchi, A., 2004. Metabolism and body composition of a copepod

- (*Neocalanus cristatus*: Crustacea) from the bathypelagic zone of the Oyashio region, western subarctic Pacific. *Marine Biology* 145, 1181-1190.
- Johnsen, S., 2001. Hidden in plain sight: The ecology and physiology of organismal transparency. *Biological Bulletin* 201, 301-318.
- Johnsen, S., 2002. Cryptic and conspicuous coloration in the pelagic environment. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269, 243-256.
- Johnsen, S., 2003. Lifting the cloak of invisibility: The effects of changing optical conditions of pelagic crypsis. *International Society for Computational Biology* 43, 580-590.
- Johnsen, S., 2005. The red and the black: Bioluminescence and the color of animals in the Deep Sea. *International Society for Computational Biology* 45, 234-246.
- Juhl, A.R., Ohman, M.D., Goericke, R., 1996. Astaxanthin in *Calanus pacificus*: Assessment of pigment-based measures of omnivory. *Limnology and Oceanography* 41, 1198-1207.
- Jungbluth, M.J., Goetze, E., Lenz, P.H., 2013. Measuring copepod naupliar abundance in a subtropical bay using quantitative PCR. *Marine Biology* 160, 3125-3141.
- Kasai, H., Nakano, Y., Ono, T., Tsuda, A., 2010. Seasonal change of oceanographic conditions and chlorophyll a vertical distribution in the southwestern Okhotsk Sea during the non-iced season. *Journal of Oceanography* 66, 13-26.
- Kasai, H., Saito, H., Yoshinori, A., Taguchi, S., 1997. Variability in timing and magnitude of spring bloom in the Oyashio region, the western subarctic Pacific off Hokkaido, Japan. *Fisheries Oceanography* 6, 118-129.
- Katayama, T., Kunisaki, Y., Shimaya, M., Simpson, K.L., Chichester, C.O., 1973. The biosynthesis of astaxanthin. XIV. The conversion of labelled β -carotene-15. $15\text{-}^3\text{H}_2$

- into astaxanthin in the crab, *Portunus trituberculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 46, 269-272.
- Kawamura, A., 1982. Food habits and prey distributions of three rorqual species in the North Pacific Ocean. *The Scientific Reports of the Whales Research institute* 34, 59-91.
- Kleppel, G.S., Willbanks, L., Pieper, R.E., 1985. Diel variation in body carotenoid content and feeding activity in marine zooplankton assemblages. *Journal of Plankton Research* 7, 569-580.
- Kobari, T., Ikeda, T., 1999. Vertical distribution, population structure and life cycle of *Neocalanus cristatus* (Crustacea: Copepoda) in the Oyashio region, with notes on its regional variations. *Marine Biology* 134, 683-696.
- Kobari, T., Ikeda, T., 2001a. Life cycle of *Neocalanus flemingeri* (Crustacea: Copepoda) in the Oyashio region, western subarctic Pacific, with notes on its regional variations. *Marine Ecology Progress Series* 209, 243-255.
- Kobari, T., Ikeda, T., 2001b. Ontogenetic vertical migration and life cycle of *Neocalanus plumchrus* (Crustacea: Copepoda) in the Oyashio region, with notes on regional variations in body size. *Journal of Plankton Research* 23, 287-302.
- Kobari, T., Ikeda, T., Kanno, Y., Shiga, N., Takagi, S., Azumaya, T., 2003. Interannual variations in abundance and body size in *Neocalanus* copepods in the central North Pacific. *Journal of Plankton Research* 25, 483-494.
- Kobari, T., Inoue, Y., Nakamura, Y., Okamura, H., Ota, T., Nishibe, Y., Ichinomiya, M., 2010. Feeding impacts of ontogenetically migrating copepods on the spring phytoplankton bloom in the Oyashio region. *Deep-Sea Research II* 57, 1703-1714.
- Kobari, T., Moku, M., Takahashi, K., 2008. Seasonal appearance of expatriated boreal

- copepods in the Oyashio-Kuroshio mixed region. *ICES Journal of Marine Science* 65, 469-476.
- Kobari, T., Mori, H., Tokushige, H., 2013. Nucleic acids and protein content in ontogenetically migrating copepods in the Oyashio region as influenced by development stage and depth distribution. *Journal of Plankton Research* 35, 97-104.
- Kobari, T., Nagaki, T., Takahashi, K., 2004. Seasonal changes in abundance and development of *Calanus pacificus* (Crustacea: Copepoda) in the Oyashio-Kuroshio Mixed Region. *Marine Biology* 144, 713-721.
- Koga, F., 1984. Morphology, ecology, classification and specialization of copepods nauplius. *Bulletin of Nansei National Fisheries Research Institute* 16, 95-229 (in Japanese with English abstract).
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289-1291.
- Kuhn, P., Browman, H.I., McArthur, B., St-Pierre, J.F., 1999. Penetration of ultraviolet radiation in the waters of the estuary and Gulf of St. Lawrence. *Limnology and Oceanography* 44, 710-716.
- Kusaka, A., Ono, T., Azumaya, T., Kasai, H., Oguma, S., Kawasaki, Y., Hirakawa, K., 2009. Seasonal variations of oceanographic conditions in the continental shelf area off the eastern Pacific coast of Hokkaido, Japan. *Oceanography in Japan* 18, 135-156 (in Japanese with English abstract).
- Laakmann, S., Auel, H., Kochzius, M., 2012. Evolution in the deep sea: biological traits, ecology and phylogenetics of pelagic copepods. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65, 535-546.
- Lampert, W., 1993. Ultimate causes of diel vertical migration of zooplankton: New

- evidence for the predator-avoidance hypothesis. *Archiv für Hydrobiologie-Beiheft Ergebnisse der Limnologie* 39, 79-88.
- Landry, M.R., 1978. Population dynamics and production of a planktonic marine copepod, *Acartia clausii*, in a small temperate lagoon on San Juan Island, Washington. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 63, 77-119.
- Landry, M.R., 1983. The development of marine calanoida copepods with comment on the isochronal rule. *Limnology and Oceanography* 28, 614-624.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lee, R.F., Hagen, W., Kattner, G., 2006. Lipid storage in marine zooplankton. *Marine Ecological Progress Series* 307, 273-306.
- Lee, R.F., Nevenzel, J.C., Lewis, A.G., 1974. Lipid changes during life cycle of marine copepod, *Euchaeta japonica* Marukawa. *Lipids* 9, 891-898.
- Le Goff-Vitry, M.C., Chipman, A.D., Comtet, T., 2007. *In situ* hybridization on whole larvae: a novel method for monitoring bivalve larvae. *Marine Ecology Progress Series* 343, 161-172.
- Liñán-Cabello, M.A., Paniagua-Michel, J., Hopkins, P.M., 2002. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition* 8, 299-309.
- Lindeque, P.K., Harris, R.P., Jones, M.B., Smerdon, G.R., 1999. Simple molecular method to distinguish the identity of *Calanus* species (Copepoda: Calanoida) at any developmental stage. *Marine Biology* 133, 91-96.
- Lindeque, P.K., Harris, R.P., Jones, M.B., Smerdon, G.R., 2004. Distribution of *Calanus*

- spp. as determined using a genetic identification system. *Scientia Marina* 68, 121-128.
- Lindeque, P.K., Hay, S.J., Heath, M.R., Ingvarsdottir, A., Rasmussen, J., Smerdon, G.R., Waniek, J.J., 2006. Integrating conventional microscopy and molecular analysis to analyse the abundance and distribution of four *Calanus* congeners in the North Atlantic. *Journal of Plankton Research* 28, 221-238.
- Liu, H., Dagg, M.J., Napp, J.M., Sato, R., 2008. Mesozooplankton grazing in the coastal Gulf of Alaska: *Neocalanus* spp. vs. other mesozooplankton. *ICES Journal of Marine Science* 65, 351-360.
- Liu, H., Dagg, M.J., Strom, S., 2005. Grazing by the calanoid copepod *Neocalanus cristatus* on the microbial foodweb in the coastal Gulf of Alaska. *Journal of Plankton Research* 27, 647-662.
- Liu, H., William, T.P., 2010. Seasonal and inter-annual variations in the abundance and biomass of *Neocalanus plumchrus* in continental slope waters off Oregon. *Fisheries Oceanography* 19, 354-369.
- Lopez, M.D.G., 1996. Effect of starvation on development and survivorship of naupliar *Calanus pacificus* (Brodsky). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 203, 133-146.
- Lotocka, M., Stycznska-Jurewicz, E., Bledxki, L.A., 2004. Changes in carotenoid composition in different developmental stages of copepods: *Pseudocalanus acuspes* Giesbrecht and *Acartia* spp. *Journal of Plankton Research* 26, 159-166.
- Luecke, C., O'Brien, W.J., 1981. Phototoxicity and fish predation: Selective factors in color morphs in *Heterocope*. *Limnology and Oceanography* 26, 454-460.
- Machida, R.J., Miya, M.U., Nishida, M., Nishida, S., 2006. Molecular phylogeny and

- evolution of the pelagic copepod genus *Neocalanus* (Crustacea: Copepoda). *Marine Biology* 148, 1071-1079.
- Machida, R.J., Tsuda, A., 2010. Dissimilarity of species and forms of planktonic *Neocalanus* copepods Using Mitochondrial COI, 12S, Nuclear ITS, and 28S Gene Sequences. *PLoS ONE* 5, e10278
- Mackas, D.L., Batten, S., Trudel, M., 2007. Effects on zooplankton of a warmer ocean: recent evidence from North Pacific. *Progress in Oceanography* 75, 223-252.
- Mackas, D.L., Goldblatt, R., Lewis, A.G., 1998. Interdecadal variation in developmental timing of *Neocalanus plumchrus* populations at Ocean Station P in the subarctic North Pacific. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 55, 1878-1893.
- Mackas, D.L., Greve, W., Edwards, M., Chiba, S., Tadokoro, K., Eloire, D., Mazzocchi, M.G., Batten, S., Richardson, A.J., Johnson, C., Head, E., Conversi, A., Peluso, T., 2012. Changing zooplankton seasonality in a changing ocean: Comparing time series of zooplankton phenology. *Progress in Oceanography* 97-100, 31-62.
- Mackas, D.L., Sefton, H., Miller, C.B., Raich, A., 1993. Vertical habitat partitioning by large calanoida copepods in the oceanic subarctic Pacific during spring. *Progress in Oceanography* 32, 259-294.
- Mackas, D.L., Tsuda, A., 1999. Mesozooplankton in the eastern and western subarctic Pacific: community structure, seasonal life histories, and interannual variability. *Progress in Oceanography* 43, 335-363.
- Madsen, S.D., Nielsen, T.G., Hansen, B.W., 2001. Annual population development and production by *Calanus finmarchicus*, *C. glacialis* and *C. hyperboreus* in Disko Bay, western Greenland. *Marine Biology* 139, 75-93.
- Maps, F., Plourde, S., Zakardjian, B., 2010. Control of dormancy by lipid metabolism in

- Calanus finmarchicus*: a population model test. Marine Ecology Progress Series 403, 165-180.
- Marshall, S.M., Orr, A.P., 1955. The biology of a marine copepod *Calanus finmarchicus* (Gunnerus). Oliver & Boyd, Edinburgh: 188 pp.
- Matthews, J.B.L., 1964. On the biology of some bottom-living copepods (*Aetideidae* and *Phaennidae*) from western Norway. Sarsia 16, 1-46.
- Matsuno, K., Yamaguchi, A., Shimada, K., Imai, I., 2012. Horizontal distribution of calanoid copepods in the western Arctic Ocean during the summer of 2008. Polar Science 6, 105-119.
- Matsuno, T., 2001. Aquatic animal carotenoids. Fisheries Science 67, 771-783.
- McBeath, A.J.A., Penston, M.J., Snow, M., Cook, P.F., Bricknell, I.R., Cunningham, C.O., 2006. Development and application of real-time PCR for specific detection of *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongates* larvae in Scottish plankton samples. Diseases of Aquatic Organisms 73, 141-150.
- McLaren, I.A., 1963. Effects of temperature on growth of zooplankton and the adaptive value of vertical migration. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 20, 685-727.
- McLaren, I.A., Sevigny, J.M., Corkett, C.J., 1988. Body size, development rates, and genome sizes among *Calanus* species. Hydrobiologia 167/168, 275-284.
- Melle, W., Skjoldal, H.R., 1998. Reproduction and development of *Calanus finmarchicus*, *C. glacialis* and *C. hyperboreus* in the Barents Sea. Marine Ecology Progress Series 169, 211-228.
- Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Simoni, P., Baraldini, M., Laude, L.D., Roda, A., 2007. One-step triplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of

- Yellowfin (*Thunnus albacares*), Bigeye (*Thunnus obesus*), and Skipjack (*Katsuwonous pelamis*) tuna DNA from fresh, frozen, and canned tuna samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7638-7647.
- Miki, W., 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 63. 141-146.
- Miller, C.B., 1988. *Neocalanus flemingeri*, a new species of Calanidae (Copepoda: Calanoida) from the subarctic Pacific Ocean, with a comparative redescription of *Neocalanus plumchrus* (Marukawa) 1921. *Progress in Oceanography* 20, 223-273.
- Miller, C.B., 1993. Development of large copepods during spring in the Gulf of Alaska. *Progress in Oceanography* 32, 295-317.
- Miller, C.B., Clemons, M.J., 1988. Revised life history analysis for large grazing copepods in the subarctic Pacific Ocean. *Progress in Oceanography* 20, 293-313.
- Miller, C.B., Frost, B.W., Batchelder, H.P., Clemons, M.J., Conway, R.E., 1984. Life histories of large, grazing copepods in subarctic ocean gyre: *Neocalanus plumchrus*, *Neocalanus cristatus*, and *Eucalanus bungii* in the northeast Pacific. *Progress in Oceanography* 13, 201-243.
- Miller, C.B., Grigg, H., 1991. An experimental study of the resting phase in *Calanus finmarchicus* (Gunnerus). *Bulletin of Plankton Society of Japan Special Volume* 177, 479-493.
- Miller, C.B., Morgan, C.A., Prahl, F.G., Sparrow, M.A., 1998. Storage lipids of the copepod *Calanus finmarchicus* from Georges Bank and the Gulf of Maine. *Limnology and Oceanography* 43, 488-497.
- Miller, C.B., Terazaki, M., 1989. Life histories of *Neocalanus flemingeri* and *Neocalanus plumchrus* in the Sea of Japan. *Bulletin of Plankton Society of Japan* 36, 27-41.

- Minegishi, Y., Yoshinaga, T., Aoyama, J., Tsukamoto, K., 2009. Species identification of *Anguilla japonica* by real-time PCR based on sequence detection system: a practical application to eggs and larva. ICES Journal of Marine Science 66, 1915-1918.
- Miner, B.G., Morgan, S.G., Hoffman, J.R., 2000. Postlarval chromatophores as an adaptation to ultraviolet radiation. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 249, 235-248.
- Moku, M., Kawaguchi, K., Watanabe, H., Ohno, A., 2000. Feeding habits of three dominant myctophid fishes, *Diaphus theta*, *Stenobrachius leucopsarus* and *S. nannochir*, in the subarctic and transitional waters of the western North Pacific. Marine Ecology Progress Series 207, 129-140.
- Morgan, S.G., Christy, J.H., 1996. Survival of marine larvae under the countervailing selective pressures of photodamage and predation. Limnology and Oceanography 41, 498-504.
- Mori, M., Lindsay, D.J., 2008. Body pigmentation changes in the planktonic crustacean *Vibilia stebbingi* (Amphipoda: Hyperiidea) under different light regimes, with notes on implications for the development of automated plankton identification systems. JAMSTEC Report of Research and Development 8, 37-45 (Japanese with English abstract).
- Motoda, S., 1957. North Pacific standard net. Information Bulletin on Planktology in Japan 4, 13-15.
- Niehoff, B., Klenke, U., Hirche, H.J., Irigoien, X., Head, R., Harris, R., 1999. A high frequency time series at Weathership M, Norwegian Sea, during the 1997 spring bloom: the reproductive biology of *Calanus finmarchicus*. Marine Ecology Progress Series 176, 81-92.

- Nishida, W., Pearcy, W.G., Nemoto, T., 1988. Feeding habits of mesopelagic shrimps collected off Oregon. *Bulletin of the Ocean Research Institute, University of Tokyo* 26, 99-108.
- Nishikawa, J., Nishida, S., Moku, M., Hidaka, K., Kawaguchi, K., 2001. Biomass, abundance, and vertical distribution of micronekton and large gelatinous zooplankton in the subarctic Pacific and the Bering Sea during the summer of 1997. *Journal of Oceanography* 57, 361-375.
- Oh, B.C., Terazaki, M., Nemoto, T., 1991. Some aspects of the life history of the subarctic copepod *Neocalanus cristatus* (Calanoida) in Sagami Bay, central Japan. *Marine Biology* 111, 207-212.
- Ohman, M.D., 1987. Energy sources for recruitment of the subantarctic copepod *Neocalanus tonsus*. *Limnology and Oceanography* 32, 1317-1330.
- Ohman, M.D., Bradford, J.M., Jillett, J.B., 1989. Seasonal growth and lipid storage of the circumglobal, subantarctic copepod, *Neocalanus tonsus* (Brady). *Deep-Sea Research* 36, 1309-1326.
- Ohman, M.D., Drits, A.V., Clarke, M.E., Plourde, S., 1998. Differential dormancy of co-occurring copepods. *Deep-Sea Research II* 45, 1709-1740.
- Ohman, M.D., Eiane, K., Durbin, E.G., Runge, J.A., Hirche, H.J., 2004. A comparative study of *Calanus finmarchicus* mortality patterns at five localities in the North Atlantic. *ICES Journal of Marine Science* 61, 687-697.
- Ohman, M.D., Hirche, H.J., 2001. Density-dependent mortality in an oceanic copepod population. *Nature* 412, 638-641.
- Ohman, M.D., Runge, J.A., Durbin, E.G., Field, D.B., Niehoff, B., 2002. On birth and death in the sea. *Hydrobiologia* 480, 55-68.

- Osgood, K.E., Frost, B.W., 1994. Comparative life histories of three species of planktonic calanoid copepods in Dobob Bay, Washington. *Marine Biology* 118, 627-636.
- Pan, M., McBeath, A.J.A., Hay, S.J., Pierce, G.J., Cunningham, C.O., 2008. Real-time PCR assay for detection and relative quantification of *Liocarcinus depurator* larvae from plankton samples. *Marine Biology* 153, 859-870.
- Parent, G.J., Plourde, S., Joly, P., Turgeon, J., 2015. Phenology and fitness of *Calanus glacialis*, *C. finmarchicus* (Copepoda), and their hybrids in the St. Lawrence Estuary. *Marine Ecology Progress series* 524, 1-9.
- Parkinson, C.L., Gratz, A.J., 1983. On the seasonal sea ice cover of the Sea of Okhotsk. *Journal of Geophysical Research* 88, 2793-2802.
- Parsons, T.R., Anderson, G.C., 1970. Large scale studies of primary production in the North Pacific Ocean. *Deep-Sea Research* 17, 765-776.
- Pasternak, A.F., Arashkevich, E.G., Grothe, U., Nikishina, A.B., Solovyev, K.A., 2013. Different effects of increased water temperature on egg production of *Calanus finmarchicus* and *C. glacialis*. *Oceanology* 53, 547-553.
- Pennak, R.W., 1943. An effective method of diagramming diurnal movements of zooplankton organisms. *Ecology* 24, 405-407.
- Persaud, A.D., Moeller, R. E., Williamson, C.E., Burns, C.W., 2007. Photoprotective compounds in weakly and strongly pigmented copepods and co-occurring cladocerans. *Freshwater Biology* 52, 2121-2133.
- Peterson, W.T., 2001. Patterns in stage duration and development among marine and freshwater calanoid and cyclopoid copepods: a review of rules, physiological constraints, and evolutionary significance. *Hydrobiologia* 453/454, 91-105.
- Peterson, W.T., Painting, S.J., 1990. Developmental rates of the copepods *Calanus*

- australis* and *Calanoides carinatus* in the laboratory, with discussion of methods used for calculation of development time. *Journal of Plankton Research* 12, 283-293.
- Petterson, A., Lignell, Å., 1998. Low astaxanthin levels in the Baltic salmon exhibiting the M74 syndrome. *American Fisheries Society Symposium* 21, 26-30.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29. 2002-2007.
- Pinchuk, A.I., 1997. Naupliar development of *Metridia pacifica* (Copepoda: Calanoida) reared in the laboratory. *Journal of Crustacean Biology* 17, 343-351.
- Planque, B., Fromentin, J.M., 1996. *Calanus* and environment in the eastern North Atlantic. I. Spatial and temporal patterns of *C. finmarchicus* and *C. helgolandicus*. *Marine Ecology Progress Series* 134, 101-109.
- Planque, B., Hays, G.C., Ibanez, F., Gamble, J.C., 1997. Large scale spatial variations in the seasonal abundance of *Calanus finmarchicus*. *Deep-Sea Research I* 44, 315-326.
- Pond, D.W., Tarling, G.A., 2011. Phase transitions of wax esters adjust buoyancy in diapausing *Calanoides acutus*. *Limnology and Oceanography* 56, 1310-1318.
- Pradillon, F., Schmidt, A., Peplies, J., Dubilier, N., 2007. Species identification of marine invertebrate early stages by whole-larvae *in site* hybridization of 18S ribosomal RNA. *Marine Ecology Progress Series* 333, 103-116.
- Rey, C., Harris, R., Irigoien, X., Head, R., Carlotti, F., 2001. Influence of algal diet on growth and ingestion of *Calanus helgolandicus* nauplii. *Marine Ecology and Progress Series* 216, 151-165.
- Rhodes, A.C.E., 2007. Dietary effects on carotenoid composition in the marine harpacticoid copepod *Nitokra Lacustris*. *Journal of Plankton Research* 29, 173-183.
- Richardson, A.J., Verheye, H.M., 1999. Growth rates of copepods in the southern

- Benguela upwelling system: the interplay between body size and food. *Limnology and Oceanography* 44, 382-392.
- Ringelberg, J., 1980. Aspects of red pigmentation in zooplankton, pp. 91-97. In W.C. Kerfoot (eds.), *Ecology and evolution of zooplankton communities*. University Press of New England.
- Ringuette, M., Fortier, L., Fortier, M., Runge, J.A., Bélanger S., Larouche, P., Weslawski, J.M., Kwasniewski, S., 2002. Advanced recruitment and accelerated population development in Arctic calanoid copepods of the North Water. *Deep-Sea Research II* 49, 5081-5099.
- Rothschild, B.J., Osborn, T.R., 1988. Small-scale turbulence and planktonic contact rates. *Journal of Plankton Research* 10, 465-474.
- Sainmont, J., Andersen, K.H., Varpe, Ø., Visser, A.W., 2014. Capital versus income breeding in a seasonal environment. *The American Naturalist* 184, 466-476.
- Saito, H., Tsuda, A., 2000. Egg production and early development of the subarctic copepods *Neocalanus cristatus*, *N. plumchrus* and *N. flemingeri*. *Deep-Sea Research I* 47, 2141-2158.
- Saito, H., Tsuda, A., Kasai, H., 2002. Nutrient and plankton dynamics in the Oyashio region of the western subarctic Pacific Ocean. *Deep-Sea Research II* 49, 5463-5486.
- Sano, M., Maki, K., Nishibe, Y., Nagata, T., Nishida, S., 2013. Feeding habits of mesopelagic copepods in Sagami Bay: Insights from integrative analysis. *Progress in Oceanography* 110, 11-26.
- Sargent, J.R., Gatten, R.R., McIntosh, R., 1974. Biosynthesis of wax esters in cell-free preparations of *Euchaeta norvegica*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 47, 217-227.

- Sassa, C., Kawaguchi, K., 2005. Larval feeding habits of *Diaphus theta*, *Protomyctophum thompsoni*, and *Tarletonbeania taylori* (Pisces: Myctophidae) in the transition region of the western North Pacific. Marine Ecology Progress Series 298, 261-276.
- Saumweber, W.J, Durbin, E.G., 2006. Estimating potential diapause duration in *Calanus finmarchicus*. Deep-Sea Research II 53, 2597-2617.
- Schizas, N.V., Street, G.T., Coull, B.C., Chandler, G.T., Quattro, J.M., 1997. An efficient DNA extraction method for small metazoans. Molecular Marine Biology and Biotechnology 6, 381-383.
- Shimizu, Y., Takahashi, K., Ito, S., Kakehi, S., Tatebe, H., Yasuda, I., Kusaka, A., Nakayama, T., 2009. Transport of subarctic large copepods from the Oyashio area to the mixed water region by the coastal Oyashio intrusion. Fisheries Oceanography 18, 312-327.
- Shimode, S., Hiroe, Y., Hidaka, K., Takahashi, K., Tsuda, A., 2009. Life history and ontogenetic vertical migration of *Neocalanus gracilis* in the western North Pacific Ocean. Aquatic Biology 7, 295-306.
- Shimode, S., Toda, T., Kikuchi, T., 2006. Spatio-temporal changes in diversity and community structure of planktonic copepods in Sagami Bay. Japan. Marine Biology 148, 581-597.
- Shiomoto, A., Asami, H. 1999. High-west and low-east distribution patterns of chlorophyll a, primary productivity and diatoms in the subarctic North Pacific surface waters, midwinter 1996. Journal of Oceanography 55, 493-503.
- Shoden, S., Ikeda, T., Yamaguchi, A., 2005. Vertical distribution, population structure and lifecycle of *Eucalanus bengii* (Copepoda: Calanoida) in the Oyashio region, with

- notes on its regional variations. *Marine Biology* 146, 497-511.
- Sinha, R.P., and Häder, D.P., 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *The Royal Society of Chemistry and Owner Societies* 1, 225-236.
- Snoeijs, P., Häubner, N., 2014. Astaxanthin dynamics in Baltic Sea mesozooplankton communities. *Journal of Sea Research* 85, 131-143.
- Sohrin, R., Imazawa, M., Fukuda, H., Suzuki, Y., 2010. Full-depth profiles of prokaryotes, heterotrophic nanoglagellates, and ciliates along a transect from the equatorial to the subarctic central Pacific Ocean. *Deep-Sea Research II* 57, 1537-1550.
- Sommer, F., Agurto, C., Henriksen, P., Kiørboe, T., 2006. Astaxanthin in the calanoida copepod *Calanus helgolandicus*: dynamics of esterification and vertical distribution in the German Bight, North Sea. *Marine Ecology Progress Series* 319, 167-173.
- Speirs, D.C., Gurney, W.S.C., Heath, M. Wood, S.N., 2005. Modeling the basin-scale demography of *Calanus finmarchicus* in the north-east Atlantic. *Fisheries Oceanography* 14, 333-358.
- Stearns, S.C., 1992. *The evolution of life history*. Oxford University: 249 pp.
- Storz, U.C., Paul, R.J., 1998. Phototaxis in water fleas (*Daphnia magna*) is differently influenced by visible and UV light. *Journal of Comparative Physiology A* 183, 709-717.
- Strom, S.L., Postel, J.R., Booth, B.C., 1993. Abundance, variability, and potential grazing impact of planktonic ciliates in the open subarctic Pacific Ocean. *Progress in Oceanography* 32, 185-203.
- Suzuki, K., Kuwata, A., Yoshie, N., Shibata, A., Kawanobe, K., Saito, H., 2011. Population dynamics of phytoplankton, heterotrophic bacteria, and viruses during

- the spring bloom in the western subarctic Pacific. *Deep-Sea Research I* 58, 575-589.
- Suzuki, R., Ishimaru, T., 1990. An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using N, N-dimethylformamide. *Journal of Oceanographical Society of Japan* 46, 190-194.
- Suzuki, T., Taniguchi, A., 1998. Standing crops and vertical distribution of four groups of marine planktonic ciliates in relation to phytoplankton chlorophyll a. *Marine Biology* 132, 375-382.
- Swalethorp, R., Kjellerup, S., Dünweber, M., Nielsen, T.G., Møller, E.F., Rysgaard, S., Hansen, B.W., 2011. Grazing, egg production, and biochemical evidence of differences in the life strategies of *Calanus finmarchicus*, *C. glacialis* and *C. hyperboreus* in Disko Bay, western Greenland. *Marine Ecology Progress Series* 429, 125-144.
- Tadokoro, K., 2000. Geographical variation of chl-a seasonality in the subarctic North Pacific Ocean. *Bulletin of the Plankton Society of Japan* 47, 111-115.
- Tadokoro, K., Chiba, S., Ono, T., Midorikawa, T., Saino, T., 2005. Interannual variation in *Neocalanus* biomass in the Oyashio waters of the western North Pacific. *Fisheries Oceanography* 14, 210-222.
- Takahashi, K., Ide, K., 2011. Reproduction, grazing, and development of the large subarctic calanoida *Eucalanus bungii*: is the spring diatom bloom the key to controlling their recruitment? *Hydrobiologia* 666, 99-109.
- Takahashi, K., Kuwata, A., Saito, H., Ide, K., 2008. Grazing impact of the copepod community in the Oyashio region of the western subarctic Pacific Ocean. *Progress in Oceanography* 78, 222-240.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular

- evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.
- Tanimura, A., Hoshiai, T., Fukuchi, M., 1996. The life cycle strategy of the ice-associated copepod, *Paralabidocera Antarctica* (Calanoida, Copepoda), at Syowa Station, Antarctica. *Antarctica Science* 8, 257-266.
- Tarrant, A.M., Baumgartner, M.F., Hansen, B.H., Altin, D., Nordtug, T., Olsen, A.J., 2014. Transcriptional profiling of reproductive development, lipid storage and molting throughout the last juvenile stage of the marine copepod *Calanus finmarchicus*. *Frontiers in Zoology* 11:91, 1-15.
- Tarrant, A.M., Baumgartner, M.F., Verslycke, T., Johnson, C.L., 2008. Differential gene expression in diapausing and active *Calanus finmarchicus* (Copepoda). *Marine Ecology Progress Series* 355, 193-207.
- Tatebe, H., Yasuda, I., Saito, H., Shimizu, Y., 2010. Horizontal transport of the calanoid copepod *Neocalanus* in the North Pacific: The influences of the current system and the life history. *Deep-Sea Research I* 57, 409-419.
- Taylor, M.I., Fox, C., Rico, I., Rico, C., 2002. Species-specific TaqMan probes for simultaneous identification of (*Gadus morhua* L.), haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.) and whiting (*Merlangius merlangus* L.). *Molecular Ecology Notes* 2, 599-601.
- Teletchea, F., 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 19, 265-293.
- Terazaki, M., Tomatsu, C., 1997. A vertical multiple opening and closing plankton sampler. *Journal of Advanced Marine Science and Technology Society* 3, 127-132.
- Torrissen, O.J., Christiansen, R., 1995. Requirements for carotenoids in fish diets.

- Journal of Applied Ichthyology 11, 225-230.
- Tsuda, A., Saito, H., Kasai, H., 1999. Life histories of *Neocalanus flemingeri* and *Neocalanus plumchrus* (Calanoida: Copepoda) in the western subarctic Pacific. *Marine Biology* 135, 533-544.
- Tsuda, A., Saito, H., Kasai, H., 2001. Life history strategies of subarctic copepods *Neocalanus flemingeri* and *N. plumchrus*, especially concerning lipid accumulation patterns. *Plankton Biology and Ecology* 48, 52-58.
- Tsuda, A., Saito, H., Kasai, H., 2004. Life histories of *Eucalanus bungii* and *Neocalanus cristatus* (Copepoda: Calanoida) in the western subarctic Pacific Ocean. *Fisheries Oceanography* 13, 10-20.
- Tsuda, A., Saito, H., Kasai, H., 2014. Vertical distributions of large ontogenetically migrating copepods in the Oyashio region during their growing season. *Journal of Oceanography* 70, 123-132.
- Tsuda, A., Saito, H., Kasai, H., Nishioka, J., Nakatsuka, T., 2015. Vertical segregation and population structure of ontogenetically migrating copepods *Neocalanus cristatus*, *N. flemingeri*, *N. plumchrus*, and *Eucalanus bungii* during the ice-free season in the Sea of Okhotsk. *Journal of Oceanography* 71, 271-285.
- Turner, J.T., 2004. The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food webs. *Zoological Studies* 43, 255-266.
- Utne-Palm, A., 1999. The effects of prey mobility, prey contrast, turbidity and spectral composition on the reaction distance of *Gobiusculus flavescens* to its planktonic prey. *Journal of Fish Biology* 54, 1244-1258.
- Uye, S., 1988. Temperature-dependent development and growth of *Calanus sinicus* (Copepoda: Calanoida) in the laboratory. *Hydrobiologia* 167/168, 285-293.

- Uye, S., Huang, C., Onbe, T., 1990. Ontogenetic diel vertical migration of the planktonic copepod *Calanus sinicus* in the Inland Sea of Japan. *Marine Biology* 104, 389-396.
- Vadopalas, B., Bouma, J.V., Jackels, C.R., Friedman, C.S., 2006. Application of real-time PCR for simultaneous identification and quantification of larval abalone. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 334, 219-228.
- Van Nieuwerburgh, L., Wänstrand, I., Liu, J., Snoeijs, P., 2005. Astaxanthin production in marine pelagic copepods grazing on two different phytoplankton diets. *Journal of Sea Research* 53, 147-160.
- Varpe, Ø., Jørgensen, C., Tarling, G.A., Fiksen, Ø., 2009. The adaptive value of energy storage and capital breeding in seasonal environments. *Oikos* 118, 363-370.
- Vestheim, H., Kaartvedt, S., 2006. Plasticity in coloration as an antipredator strategy among zooplankton. *Limnology and Oceanography* 51, 1931-1934.
- Vestheim, H., Kaartvedt, S., Edvardsen, B., 2005. State-dependent vertical distribution of the carnivore copepod *Pareuchaeta norvegica*. *Journal of Plankton Research* 27, 19-26.
- Vidal, J., Smith, S.L., 1986. Biomass, growth, and development of populations of herbivorous zooplankton in the southeastern Bering Sea during spring. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research papers* 33, 523-556.
- Vinogradov, M.E., 1968. Vertical distribution of the oceanic zooplankton. Israel Program for Scientific Translations, 1970: 339 pp. (Original: Akademia Nauk SSR, Institut Okeanologii)..
- Visser, A.W., Jónasdóttir, J.H., 1999. Lipids and the seasonal vertical migration of *Calanus finmarchicus*. *Fisheries Oceanography* 8, 100-106.
- Wang, J., Zhen, Y., Mi, T., Yu, Z., Wang, G., 2015. Development of a real-time PCR assay

- (SYBR Green D) for rapid identification and quantification of scyphomedusae *Aurelia* sp.1 planulae. Chinese Journal of Oceanology and Limnology 33, 974-987.
- Watanabe, S., Minegishi, Y., Yoshinaga, T., Aoyama, J., Tsukamoto, K., 2004. A quick method for species identification of Japanese eel (*Anguilla japonica*) using Real-time PCR: an onboard application for use during sampling surveys. Marine Biotechnology 6, 566-574.
- Welschmeyer, N.A., 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and phaeopigments. Limnology and Oceanography 39, 1985-1992.
- Welschmeyer, N.A., Strom, S., Goericke, R., Ditullio, G., Belvin, M., Petersen, W., 1993. Primary production in the subarctic Pacific Ocean: Project SUPER. Progress in Oceanography 32, 101-135.
- Widder, E.A., Latz, M.I., Case, J.F., 1983. Marine bioluminescence spectra measured with an optical multichannel detection system. The Biological Bulletin 165, 791-810.
- Williams, R., Conway, D.V.P., Collins, N.R., 1987. Vertical distributions of eggs, nauplii and copepodites of *Calanus helgolandicus* (Copepoda: Crustacea) in the Celtic Sea. Marine Biology 96, 247-252.
- Wright, N.A., Suzuki, J., Vadopalas, B., Friedman, C.S., 2009. Development and optimization of quantitative PCR assays to aid *Ostrea lurida* carpenter 1864 restoration efforts. Journal of Shellfish Research 28, 33-41.
- Yamaguchi, A., Ikeda, T., Watanabe, Y., Ishizaka, J., 2004. Vertical distribution patterns of pelagic copepods as viewed from the predation pressure Hypothesis. Zoological Studies 43, 475-485.
- Yamamura, O., Honda, S., Shida, O., Hamatsu, T., 2002. Diets of walleye pollock *Theragra chalcogramma* in the Doto area, northern Japan: ontogenetic and seasonal

- variations. Marine Ecology Progress Series 238, 187-198.
- Yebra, L., Hirst A.G., Hernández-León, S., 2006. Assessment of *Calanus finmarchicus* growth and dormancy using the aminoacyl-tRNA synthetases method. Journal of Plankton Research 28, 1191-1198.
- Yoshiki, T., Ono, T., Shimizu, A., Toda, T., 2011. Effect of hydrostatic pressure on eggs of *Neocalanus* copepods during spawning in the deep-layer. Marine Ecology Progress Series 430, 63-70.
- Yoshiki, T., Yamanoha, B., Kikuchi, T., Shimizu, A., Toda, T., 2008. Hydrostatic pressure-induced apoptosis on nauplii of *Calanus sinicus*. Marine Biology 156, 97-106.