

博士学位論文審査報告書

申請者氏名	高 権楠
学位の種類	博士 (環境科学)
論文題目	Physiological responses in crustacean zooplankton to abiotic and biotic stresses, especially lowering pH and crowding (甲殻類動物プランクトンにおける生物のおよび非生物のストレスに対する生理的応答, 特に pH の低下と混み合いについて)
学籍番号	1856003
学歴	2013年9月1日 海南大学 (中国) 海洋学院水産学修士課程入学 2016年7月31日 同上修了 2018年4月1日 滋賀県立大学大学院環境科学研究科 環境動態学専攻博士後期課程入学
論文審査委員会	委員長 滋賀県立大学環境科学研究科 教授 伴 修平 委員 滋賀県立大学環境科学研究科 教授 浦部美佐子 委員 滋賀県立大学環境科学研究科 准教授 細井祥子

論文の内容の要旨

代謝速度は動物の環境変化に対する生理学的応答を理解する上で重要である。本論文で、申請者は動物プランクトンの代謝を呼吸速度として測定し、いくつかの非生物のおよび生物的環境因子に対してどのように応答するのか、非接触型の溶存酸素測定装置を用いて詳細に調べた。動物プランクトンの呼吸速度は溶存酸素量の変化量で求められてきたが、体サイズが小さいため、精度良く測定結果を得るためには多くの実験個体 (しばしば 100 個体以上) を必要とした。しかし、近年多く用いられるようになった非接触型酸素測定装置は、容器内の酸素濃度を光学的に容器の外から測定することが可能であり、1~数個体の実験動物を用いて精度良く、連続的に溶存酸素量の変化を捉えることができる。第1章では飢餓 (無給餌) に対する急性応答、第2章では餌不足に対する慢性応答について明らかにした。第3章では個体数密度と水温が呼吸速度に与える共役的な影響について、そして、第4章では低 pH に対する応答について調べた。以下にそれぞれの章における研究の概要を述べる。

第1章では、実験動物としてしばしば用いられる枝角類 *Daphnia magna* を用いて、これが飢餓に対してどのように応答するのか調べるため、2~24 時間あるいは 2~7 日の飢餓に曝した後の呼吸速度を測定した。体炭素重量で標準化した比呼吸速度 (R_w) は、若齢 (3 日令) 個体では、12 時間以内の飢餓では 0.014 h^{-1} だったものが、13 時間以上の飢餓ではおよそ $1/2$ の 0.009 h^{-1} まで低下した。一方、成体 (6 日令) では、24 時間以内の飢餓では R_w は変化せず、平均 0.009 h^{-1} であり、それ以上の期間、飢餓に曝された後では徐々に低下した。一方で、体重の変化はこれより遅れて認められ、若齢期では 24 時間以内に体重変化はみられず、成体期では 3 日目以降に体重の減少が見られた。これらのことは、*D. magna* が

飢餓に対して、まず呼吸速度を低下させて応答し、次に成長および貯蔵エネルギーを使うことで応答することを示唆した。従って、この發育段階間に見られた飢餓期間に対する応答の差は、体重差と貯蔵エネルギー量の差と考えられた。

第2章では、同じく *D. magna* を用いて、呼吸速度と共に成長と再生産を測定することで餌不足による慢性影響が代謝速度に与える影響を調べた。餌密度の変動と代謝物質の蓄積による効果を取り除くために、フロースルー装置を用いて、餌が潤沢な条件 (5×10^5 cells mL⁻¹ or 20.5 μ gC mL⁻¹) と餌不足条件 (2.5×10^3 cells mL⁻¹ or 0.1025 μ gC mL⁻¹) で飼育し、2日令から18日令まで2日間隔で呼吸速度、体サイズおよび体乾燥重量を測定し、成熟後は抱卵数を計数した。体重は4日令までは両方の餌条件で差は見られなかったが、6日令以降は餌不足条件で有意な低下が認められた。1回目の産卵数は11~12 eggsで、どちらの餌条件でも同じだったが、2回目以降の産卵では餌潤沢条件では積算産卵数が96 eggsまで増加したのに対して、餌不足条件では22 eggs程度であり、有意に低下した。呼吸速度は、餌潤沢条件では体重に依存して0.452から2.468 μ LO₂ ind. ⁻¹ h⁻¹まで変動したのに対して、餌不足条件では体重にかかわらず低い値を示し、0.281~0.627 μ LO₂ ind. ⁻¹ h⁻¹で変動した。純成長効率(純生産量/同化量)を計算すると、若齢期(4日令まで)では餌条件による差は見られず65~75%だったが、成体期(6日令)以降は、餌十分条件で60%であったのに対して餌不足条件で70%と有意に高くなった。これは、*D. magna* が餌不足環境に応答して呼吸による炭素ロスを低下させ、純生産への投資を増加させたためと解釈された。

第3章では、混み合いが代謝速度に与える影響を調べるため、*D. magna* を用いて3つの個体数密度(1、10、20 ind. 50-mL⁻¹)と2つの温度条件(10と20°C)で呼吸速度を測定した。呼吸速度は1個体で測定した結果より2つの混み合い区で有意に低下したが、その程度は20°Cでより大きかった。Q₁₀値は、個体数密度が1、10、20 ind. 50-mL⁻¹で2.29、1.98、1.63であり個体数密度に依存して変化することが分かった。先行研究によって個体数密度が増加すると摂食速度が低下することが知られており、混み合い区で見られた呼吸速度の低下は、同化量の低下を通して特異動的作用(SDA)が低下したことに起因すると考えられた。

第4章では、低pHに対する琵琶湖の主要甲殻類動物プランクトン3種の応答について調べた。琵琶湖北湖沖帯定点より、*Eodiaptomus japonicus*、*Daphnia pulex*、*Cyclopoida* spp.を採集し、餌として*Chlamydomonas reinhardtii*あるいは*Cryptomonas tetrapyrenoidosa*を充分量与えて実験室にて飼育した。これらに対して、まず低pHの急性効果を調べた。3種のプランクトンを10°Cと20°CでpH4.0~8.0に調整した試験水にて無給餌で飼育し、致死pHを24時間後のLD₅₀として求めた。プロビット変換した生残率より求めたLD₅₀は、*E. japonicus*、*D. pulex*、*Cyclopoida* spp.でそれぞれ10°Cでは5.3、4.5、4.4、20°Cでは5.2、4.5、4.2であり、低pHに対して*E. japonicus*が最も低い耐性を、そして*Cyclopoida* spp.が最も強い耐性を示した。また、どの種でもLD₅₀は10°Cで若干高く、低pH耐性は低温で低下することが分かった。呼吸速度は、*D. pulex*ではどちらの温度でもpH4.6~8.0で変化はみられなかったが、*E. japonicus*と*Cyclopoida* spp.ではpH8.0に比べてpH7.0以下では有意な低下が認められた。別途行った遊泳速度に対するpHの影響に関する実験で同様の傾向が認められたことから、低pHによる呼吸速度の低下は遊泳速度の低下に関連しているものと考えられた。

論文の審査結果

論文審査委員会は、高樺楠が提出した学位申請論文が博士（環境科学）を授与するに値すると判定した。審査過程と審査結果の概要は以下の通りである。

2022年8月4日開催の環境科学研究科会議において、申請者が提出した学位申請を受け、生態系保全研究部門の伴修平教授、浦部美佐子教授、細井祥子准教授を委員とする論文審査委員会の設置が承認された。同委員会において、学位申請論文の査読を行うとともに論文審査委員会を開催し論文の内容について審議した。さらに、学位論文審査報告会において最終試験を実施し、試験終了後、再度委員会を開催し学位論文の審査を行った。

提出された論文は、動物プランクトンの代謝に対する環境ストレスの影響を、非接触型の溶存酸素計を用いることで酸素消費量（呼吸速度）として正確に測定したものである。本方法では動物プランクトンのようなマイクロサイズの動物による呼吸速度も1個体から測定可能であり、これまでの知見で解決できなかった諸問題のいくつかを明らかにできた点が評価できる。

第1章では、飢餓に対する応答を調べたが、*D. magna*は飢餓に曝されると、成長に影響がでる閾値までは呼吸によるエネルギー消費を軽減させるよう応答することが分かった。この閾値が若齢個体（3日令）と成体（6日令）で異なったことは成長に伴う体重及び貯蔵エネルギーの違いでよく説明できた。第2章では、餌不足による慢性影響への応答を調べた。ここでも、*D. magna*はまず最初に呼吸によるエネルギー消費を軽減し、成長のためのエネルギーを担保した。変温動物の代謝速度は一般に体重と温度に依存するとされるが、これらの実験結果は動物プランクトンの代謝速度が栄養条件によって大きく変化するという大変興味深い重要な情報を提供している。第3章では、混み合いが代謝速度に与える影響を調べ、個体数密度の増加が呼吸速度を低下させることを明らかにした。既報では、動物プランクトンの呼吸速度と個体数密度の関係については、同じ材料を用いた場合でも異なる結果が報告されていたが、それらの違いが実験手順の違いに依存している可能性を指摘したのは大きな成果と云える。そして、最後に第4章では、湖沼の酸性化が動物プランクトンの生理に与える影響を知るために、低pHに対する代謝速度の応答を、琵琶湖に生息する主要な3種の動物プランクトンの呼吸速度を測定することで明らかにした。低pHに対する耐性には種による違いが見られたが、閾値以上の範囲では、*D. pulicaria*の呼吸速度には低pHによる急性影響は見られなかった。2種のカイアシ類では、pH7.0以下の時、pH8.0のときよりも有意な低下が認められ、これが遊泳速度の低下に起因することが分かった。これらの結果は、酸性雨による湖水の酸性化により、動物プランクトン個体群に急性影響は生じない可能性を示唆していて興味深い。ただし、慢性影響については今後の課題と考えられる。

これらの研究成果のうち、第4章は以下の国際陸水学会の機関誌（査読有）であるInland Water誌に報告済である。

以上のことを総合し、論文審査委員会は本論文が博士（環境科学）の学位を授与するに値するものと認めた。

Gao, H., X. Liu and S. Ban, 2022. Effect of acute acidic stress on survival and metabolic activity of zooplankton from Lake Biwa, Japan. *Inland Waters*, DOI:10.1080/20442041.2022.2058861.