

平成 29 年度山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

山梨大学大学院 教育学研究科 教科教育専攻
佐野 勲

1. 研究テーマ

淡水貝類を用いた水質浄化法の開発と DNA データベースの構築

2. 研究の目的

本研究では次の 2 つの目的を掲げ研究を推進した。

- ① 主に山梨県内の池や湖沼の水質浄化を目指して、生物的手法の一つとして、淡水貝類を用いた水質浄化法を開発し普及させる。
- ② 淡水貝類の DNA データベースを構築して公開する。

これらを目的に据え、生態学的な手法と遺伝学的な手法を用いて、研究を遂行した。

3. 材料と方法

① 淡水貝類を用いた水質浄化法の開発

水質浄化に有効な種を検討するため、粒径の明らかな鉱物粒子カオリン（粒径 4、2、0.2 μm）を用いて人工的に濁度を上げた水槽内で、淡水貝類の種による浄化能力の差異を調べた。水槽実験では、温度条件（室温、10°C、30°C）を変えて粒径毎に実験を行った。また、カオリンのかわりに実際に貝類が捕食すると思われる藻類のクロレラを用い、浄化能力を比較した。本研究では産地や種名が明確であるイシガイ類（イケチョウガイ、ヨコハマシジラガイ、カワシンジユガイ、ヌマガイ、カラスガイ、タテボシガイ）、マルスダレガイ類（セタシジミ）、原始紐舌類（ヒメタニシ）、吸腔類（カワニナ）を用いた。淡水貝類による浄化効率 FR（%）を次のような式を用いて比較した。FR は貝類 1 g 当たり初めの濁度の何%を減らすことができるかを表している。

$$FR = \{ (T_{init} - T_{fin}) / T_{init} - (t_{init} - t_{fin}) / t_{init} \} / G \times 100$$

(T_{init} , 実験開始時の濁度 (FTU) ; T_{fin} , 実験終了後の濁度 (FTU) ; t_{init} , 対照実験開始時の濁度 (FTU) ; t_{fin} , 対照実験終了時の濁度 (FTU) ; G , 実験に使用した淡水貝類の総湿重量 (g))

野外においても淡水貝類が水質浄化に有効であることを確かめるため、2016 年 5 月より都市型公園内の池に条件を変えた 6 つの閉鎖区画（貝 50 個体網、貝 100 個体網、貝 50 個体網+水草、貝 50 個体カゴ、凝集剤、対照）を設け、水槽実験で浄化能力が高かったタテボシガイを導入して、1 ヶ月ごとに濁度と透視度の変化を測定し、3 ヶ月ごとに成長量を計測した。

② 淡水貝類の DNA のデータベースの構築

本研究では、日本に生息するイシガイ目の 18 種（73 個体）を用いた。近藤（2015）の分類体系に従い、サンプルを形態学的特徴によって暫定的に同定した。斧足（約 25 μg）から DNA を抽出したのち、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域（約 460 bp）及び COI 領域（約 550 bp）の塩基配列を増幅するため PCR を行った。シーケンスリアクションの後、塩基配列を決定し、近隣結合法（NJ 法）と最大節約法（MP 法）、ベイズ法（BI 法）により系統樹を構築した。

4. 結果

① 淡水貝類を用いた水質浄化法の開発

■ 淡水貝類の浄化能力の比較

(1) 室温条件における浄化効率の比較

カオリンの粒径に関係なく淡水貝類のどの種を用いても対象実験よりも濁度の低下が見られた（Table 1）。粒径 4 μm のカオリンを用いた場合に浄化効率が高かったもの（最も高かったものから 3 番目まで）は大型ヌマガイ、セタシジミ、ヨコハマシジラガイであった。粒径 2 μm のカオリンを用いた場合には、河口湖タテボシガイ、大型ヌマガイ、山中湖タテボシガイであり、粒径 0.2 μm のカオリンを用いた場合には、ヒメタニシ、大型ヌマガイ、小型ヌマガイであった。

(2) 低水温条件における浄化効率の比較

カオリンの粒径に関係なく淡水貝類のどの種を用いても対象実験よりも濁度の低下が見られた（Table 1）。粒径 4 μm のカオリンを用いた場合に浄化効率が高かったものはヨコハマシジラガイ、山中湖タテボシガイであった。粒径 2、0.2 μm のカオリンを用いた場合には、ヨコハマシジラガイであった。

(3) 高水温条件における浄化効率の比較

カオリンの粒径に関係なく淡水貝類のどの種を用いても対照実験よりも濁度の低下がみられた (Table 1)。粒径 4 μm のカオリンを用いた場合に浄化効率が高かったもの (最も高かったものから 3 番目まで) は中型ヌマガイ、ヒメタニシ、山中湖タテボシガイであり、特に中型ヌマガイの浄化効率が高かった。粒径 2、0.2 μm のカオリンを用いた場合には、ヨコハマシジラガイ、ヒメタニシ、山中湖タテボシガイであり、特に粒径 0.2 μm のカオリンを用いた場合のヨコハマシジラガイの浄化効率が高かった。

(4) クロレラを用いた場合の浄化効率の比較

どちらの種を用いても対象実験よりも濁度の低下が見られた (Table 1)。遮光した場合としない場合で大きな差はみられなかった。

(5) 大型水槽における浄化効率の比較

大型水槽の実験においては、実験開始時の濁度 (カオリンの濃度) など条件は異なるものの、小型水槽と同様に淡水貝類による濁度の低下が見られた (Table 1)。カオリンの粒径に関係なく淡水貝類のどの種を用いても対象実験よりも濁度の低下が見られた。粒径 4 μm のカオリンを用いた場合に浄化効率が高かったものはヒメタニシであった。粒径 2 μm のカオリンを用いた場合には、ヒメタニシ、セタシジミ、山中湖タテボシガイであった。粒径 0.2 μm のカオリンを用いた場合には、山中湖タテボシガイであった。

■ 野外の水系でのタテボシガイの水質浄化および成長量

タテボシガイを玉諸公園の池に 2016 年 5 月に設置し、2017 年 7 月まで 1 ヶ月ごとに濁度および透視度の測定を行った。また、3 ヶ月ごとに閉鎖区画からタテボシガイを取り出し成長量を測定した。閉鎖区画ごとの設定を Table 2 に示す。各閉鎖区画の濁度を Figure 1 に、透視度を Figure 2 に示す。また各閉鎖区画のタテボシガイの成長量を Figure 3 に示す。

(1) 各閉鎖区画の濁度及び透視度

対照実験 Co と比較して、すべての閉鎖区画で濁度の低下及び透視度の上昇が見られた。ただし、網にタテボシガイ 50 個体を入れた区画 D では、12 月と 1 月の濁度および透視度が対照実験の値と同程度になった。凝集剤を用いた区画 PG では水質の改善は見られたが、ほとんどの場合で貝類を入れた区画のほうが水質が良くなった。各閉鎖区画の比較でカゴにタテボシガイ 50 個体入れた区画 A と網にタテボシガイ 50 個体入れた区画 D では、底生環境を模した A の方が水質がよくなった。網にタテボシガイ 100 個体入れた区画 B と網にタテボシガイ 50 個体入れた区画 D では、個体数の多い B の方が水質が良くなった。網にタテボシガイ 50 個体入れ、水草と同伴させた区画 C と網にタテボシガイ 50 個体入れた区画 D では、水草を同伴させた C の方が水質が良くなった。

(2) 成長量の測定

成長量の測定では、全ての閉鎖区画で 2016 年 5 月から 2017 年 4 月にかけて平均殻長、平均殻高、平均殻幅は増加したが、平均湿重量のみ 9 月に減少し、1 月に上昇した。

② 淡水貝類の DNA のデータベースの構築

日本産イシガイ目全 18 種 73 個体を用い、ミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (321 bp) を決定して系統樹を構築した (Figure 4)。MP 法とベイズ法により構築した系統樹は、NJ 法により構築した系統樹とおおよそ一致した。日本産イシガイ類は、高い信頼度で支持される 2 つの単系統群に分けられ、近藤 (2015) の分類体系でいえば、それらはカワシシジラガイ科とイシガイ科に相当した。さらに、イシガイ科は、2 つの単系統群に分けられ、それらはイシガイ亜科とニシウネヌマガイ亜科に相当した。ほとんどの属は、高い信頼度で単系統群を形成した。唯一の例外はドブガイ属で、多系統群を形成した。本研究では、種は同じであるが、産地が異なるサンプルも多く用いたが、ほとんどの種は、高い信頼度で単系統群を形成した。たとえば、カタハガイは滋賀県、岐阜県、京都府のサンプルを、トンガリササノハガイは滋賀県、岐阜県、広島県のサンプルを、マツカサガイは広島県、奈良県、岐阜県、山形県のサンプルを用いたが、それらの種はそれぞれ単系統群を形成した。しかしながら、オトコタテボシガイ属に属するヨコハマシジラガイとオトコタテボシガイ、ニセマツカサガイの 3 種の中で、ヨコハマシジラガイは単系統群を形成したが、オトコタテボシガイとニセマツカサガイは単系統群を形成しなかった。また、ヌマガイとタガイの 2 種は、複雑な系統関係を示し、いずれも単系統群を形成しなかった。紀平ほか (2003) の 2 亜種 (タテボシガイとイシガイ) は、いずれも単系統群を形成しなかった。

また、16S rRNA 遺伝子の解析で使用したのと同じ個体を用いて、COI 遺伝子の塩基配列 (539 bp) を決定して系統樹を構築した (Figure 5)。MP 法とベイズ法により構築した系統樹は、NJ 法により構築した系統樹とおおよそ一致した。イシガイ属+オトコタテボシガイ属は高い信頼度で支持されたが、他の属間の関係は高い信頼度で支持されなかった。16S rDNA と COI に基づく系統樹の間でササノハガイ属とカタハガイ属の位置が大きく異なった。16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹では、イシガイ属+オトコタテボシガイ属がササノハガイ属と姉妹群を形成したが、COI 遺伝子に基づく系統樹では、それらは姉妹群を形成しなかった。ほとんど

どの種は単系統群を形成した。しかしながら、ニセマツカサガイは単系統群を形成しなかった。また、16S rRNA 遺伝子の解析結果 (Figure 4) と同様、ヌマガイとタガイの 2 種は、単系統群を形成しなかった。タテボシガイは単系統群を形成したが、イシガイは側系統群を形成した。

16S rRNA 遺伝子と COI 遺伝子の塩基配列を合体して系統樹を構築した (Figure 6)。MP 法とベイズ法により構築した系統樹は、NJ 法により構築した系統樹とおおよそ一致した。合体系統樹では、解析に用いる情報量を増やしたため、16S rRNA 遺伝子や COI 遺伝子単独による系統樹よりも全体的に高い信頼度が示された。日本産イシガイ類は、高い信頼度で支持される 2 つの単系統群に分けられ、各々近藤 (2015) のカワシンジュガイ科とイシガイ科に相当した。ほとんどの属と種は、高い信頼度で単系統群を形成した。しかしながら、ニセマツカサガイ、ヌマガイ、タガイはそれぞれ、単系統群を形成しなかった。タテボシガイは単系統群を形成したが、イシガイは側系統群を形成した。

5. 考察

① 淡水貝類を用いた水質浄化法の開発

■ 淡水貝類の浄化能力の比較

水槽実験では、いずれの淡水貝類も浄化能力を示したが、ヨコハマシジラガイとタテボシガイは室温条件、高水温条件で浄化効率が高く、低水温条件では浄化効率が落ちるものの、懸濁粒子を濾過していた。クロレラを用いた実験でも高い浄化効率を示したので、現時点ではこの 2 種が水質浄化に最も有効であることが示された。巻貝類では、濾過摂食を行うとされるヒメタニシは、二枚貝類に匹敵する高い浄化効率を示したが、濾過摂食を行わないカワニナでもある程度の浄化能力がみられ、これは粘液効果によると思われる。ヌマガイでは大型個体と小型個体を用いたが、両者の浄化効率に有意な差はなかった。また、タテボシガイでは河口湖産のものと同山湖産のものを用いたが、両者の浄化効率に有意な差はなかった。それゆえ、同じ種であれば濾過効率はサイズや産地に関係なく比較的安定していると言える。生物学的浄化に淡水貝類を用いる場合には、その地域の特性にあったものを選ぶこと、また、絶滅が危惧されている種も少なくないので、大規模な水質浄化を行う際には個体数を減少させないことに配慮する必要がある。例えば、実験で用いたヨコハマシジラガイは準絶滅危惧に指定されており、カラスガイ、イケチョウガイ、カワシンジュガイは、それぞれ準絶滅危惧、絶滅危惧 I 類、絶滅危惧 II 類に指定されている。保護すべき対象であるので、大規模な水質浄化を行う際には適していない。希少性に加えて地域の特性にあった種を選定するためさらに多くの種類の浄化効率を検討する必要がある。

■ 野外の水系でのタテボシガイの水質浄化および成長量

(1) 各閉鎖区画の濁度及び透視度

野外の水系 (山梨県内の玉諸公園) で行った水質浄化実験では、一部の期間を除いて対照実験 Co と比較してすべての閉鎖区画で濁度の低下および透視度の上昇が見られた。よって、野外の水系においてタテボシガイを用いた水質浄化は有効であると考えられる。カゴにタテボシガイ 50 個体入れた区画 A と網にタテボシガイ 50 個体入れた区画 D では、タテボシガイは底生環境で生活しているため、その環境に近いカゴに入れる方が網に入れるより、水質浄化には効果的であった。網にタテボシガイ 100 個体入れた区画 B と網にタテボシガイ 50 個体入れた区画 D では、実験で使用した閉鎖区画の体積では、タテボシガイ 100 個体を入れた方が浄化効率が高くなることが示された。網にタテボシガイ 50 個体入れ、水草と同伴させた区画 C と網にタテボシガイ 50 個体入れた区画 D では、水草と同伴させた場合、植栽した水草が窒素やリンを固定することで相乗的に浄化効率が向上したと考えられる。

(2) 成長量の測定

平均湿重量が一時期減少したのは、濾過摂食により得たエネルギーが、殻長、殻高、殻幅の成長に使われ、さらに繁殖期に入ったタテボシガイの生殖に使われたためと考えられる。公園に導入したタテボシガイは池内の懸濁微粒子を摂食して成長しており、淡水貝類による水質浄化は効果的である事を示した。

② 淡水貝類の DNA のデータベースの構築

日本産イシガイ類は基本的に 2 つの単系統群に分けられ、近藤 (2015) の分類体系でいえば、それらはカワシンジュガイ科とイシガイ科に相当した。近藤 (2015) によると、カワシンジュガイ科は鰓の隔膜が不完全で、斜めに走る一方、イシガイ科は鰓の隔膜が完全で、垂直に走る。Rosenberg *et al.* (1994) は、核のリボソーム遺伝子 (28S rRNA) の D6 領域 (約 150 bp) を分析し、イシガイ目を含む軟体動物の予備的な分子系統学的解析を行い、「カワシンジュガイ科の種が他のイシガイ目の種と区別できる」ことを報告した。本研究の系統関係はこれを支持し、日本国内のイシガイ目は、カワシンジュガイ科とイシガイ科に分けられることを確認した。カワシンジュガイ科において、Takeuchi *et al.* (2015) は、ミトコンドリア COI 遺伝子に基づき、カワシンジュガイとコガ

タカワシンジュガイが区別できることを報告したが、本研究もその結果を支持した。

近藤（2015）は、イシガイ科がイシガイ亜科とニシウネヌマガイ亜科の2亜科に分けられることを報告し、垂三角形で刺状突起があるグロキディウム幼生をもつものをイシガイ亜科、基本的に楕円形で刺状突起がないグロキディウム幼生をもつものをニシウネヌマガイ亜科とした。16S rRNA 系統樹と合体系統樹は、この分類を支持し、COI 系統樹もまた、カタハガイを除き、これを支持した。近藤（2015）は、貝殻の形態に基づき、日本産イシガイ目を12属18種に分類した。本研究では、ほとんどの属は高い信頼度で支持された。いくつかの種を除き、ほとんどの種も高い信頼度で支持された。しかし、ドブガイ属は複雑な系統関係を示した。ドブガイ属は、全国的に分布し、環境によって最も地域変異の多いグループである（紀平ほか, 2003）。本研究で用いたヌマガイ（fk168, FUKUNUMA 22, KONZAISYU E）とタガイ（fk20f, fk35f, fk59f）は、形態が地域固有化している可能性があると思われる。ドブガイ属の系統関係を正確に明らかにするために、今後より多くの個体を用いて解析を行う必要がある。

紀平ほか（2003）は、琵琶湖固有亜種としてササノハガイを報告し、日本に広く分布するトンガリササノハガイと区別した。しかし、近藤（2015）によると、ササノハガイは形態学的にトンガリササノハガイと区別できず、また、白井（2009）のミトコンドリア COI-COII による解析でも、その両者は区別できなかった。紀平ほか（2003）は、琵琶湖固有亜種として、メンカラスガイを報告した。しかし、近藤（2015）は、メンカラスガイをカラスガイの湖沼型とし、亜種と認めなかった。したがって、本研究では、トンガリササノハガイやメンカラスガイは用いなかった。また、紀平ほか（2003）は、イシガイ属として2亜種（タテボシガイとイシガイ）を報告し、近藤（1997）は、乳白色のグロキディウム幼生をもつものをタテボシガイ、褐色のグロキディウム幼生をもつものをイシガイとした。その後、近藤（2015）は、オバエボシガイやトンガリササノハガイに見られるように、幼生の色彩には個体変異があるので、この形質を分類に使うのは問題だったかもしれないと疑問を投げかけた。本研究では、タテボシガイとイシガイのそれぞれが同時に単系統群を形成することはなかったが、イシガイ属の全体は大きい信頼度で支持された。したがって、タテボシガイとイシガイを合わせて、1つの分類群として扱うべきであると考えられる。

本研究では、日本産イシガイ目の系統関係を初めて明らかにし、主に形態学的観点から構築された近藤（2015）の分類体系を支持した。本研究の遺伝学的な解析で得られた系統関係と近藤（2015）の形態学に基づいた分類体系が一致していることを考えると、ミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子は、イシガイ目の系統関係を解明するのに適しているといえる。しかしながら、16S rRNA の系統樹と COI の系統樹の樹形は一致しなかった。16S rRNA + COI に基づく系統樹は、16S rRNA 単独の樹形に近くなり、樹形の信頼度も高かった。したがって、16S rRNA は COI よりも多くの系統学的な情報をもっていると考えられる。16S rRNA + COI は、日本産タニシ類の系統解析でも用いられており（Hirano *et al.*, 2015）、彼らは、4種の日本産タニシ類と数種の東アジア産タニシ類の系統関係を明らかにした。したがって、16S rRNA + COI に基づく解析結果は、信頼できる系統関係を提供していると思われる。

また、Lopes-Lima *et al.*（2017）は、トンガリササノハガイなどを含む Lanceolariini 族をカラスガイやヌマガイなどを含むドブガイ亜科（Anodontinae）に分類した。我々の COI 遺伝子の解析結果はこの分類を支持したが、16S 遺伝子や 16S + COI の解析結果は、Lanceolariini 族をドブガイ亜科ではなく、貝殻の形態がより類似するヨコハマシジラガイやタテボシガイなどを含むイシガイ亜科（Unioninae）に分類すべきであることを支持した。

イシガイ科の生息は、危機的な状況にある。分類体系と遺伝的多様性の両方を正確に知ることができれば、イシガイ科を保護するために有益な情報が得られる。淡水二枚貝類は、様々な生物と密接な関係を持ち、生物多様性ホットスポット（生物多様性が高いにもかかわらず、人間による破壊の危機に瀕している地域）を特定するための重要な情報を提供する。しかし、それは分類体系が確立され、進化的な関係（系統関係）が十分にわかっているときに限られる。本研究の報告は、分子系統学の観点から日本産淡水生イシガイ目の系統関係を明らかにし、分類体系の構築に貢献した数少ない報告であり、保全調査に有益な情報を提供し、イシガイ目の保護活動を促進すると思われる。

6. 今後の展望

① 淡水貝類を用いた水質浄化法の開発

可能な限り多くの淡水貝類の水質浄化能力を比較して、貝類を用いた水質浄化法の有効性を示し、日本各地の特性にあった方法を確立する。また、貝類の滋養となる緑藻類以外の植物を用いて、貝類の水質浄化能力を比較する。さらに野外実験では貝類が死ぬと水質汚染の原因になりかねないので、貝類の生存率を上げつつ効果的な浄化効率を保ち、しかも回収が容易な設置方法や時期を検討する。

② 淡水貝類の DNA のデータベースの構築

イシガイ目の二枚貝は他の淡水生物と密接に関係しており、生態系の中で重要な役割を果たしている。特に淡水魚のタナゴ類は、

イシガイ目を産卵床としており、タナゴ類の生息にはイシガイ目二枚貝が必要不可欠である。ヨコハマシジラガイやマツカサガイは絶滅危惧 IA 類 (CR) のミヤコタナゴや準絶滅危惧 (NT) のヤリタナゴを含むタナゴ類の産卵母貝となるので、これらの二枚貝の減少や絶滅はタナゴ類の絶滅と直結している。それゆえ淡水二枚貝類を保護することは他の絶滅危惧種を救うことにもなる。それとともに希少生物の系統保存の概念に基づき、種を保護するだけでなく、独特な進化的背景をもつ種内集団を保全単位とし、保護施策を立案する必要性が唱えられている。

そこで今後は、淡水二枚貝類とタナゴ類の種内集団・個体群の類縁関係を遺伝学的に解析して進化的な背景を明らかにし、保全単位の設定等保護の指針を提案することにも取り組んでいく。

7. 研究成果の発信方法

本研究は水質浄化法を開発し定着する応用的な側面と、淡水貝類の DNA データベースを構築する基礎的な側面をもつ。

前者は、助成期間中に以下の学会・研究発表会で発表した。

- [1] 保坂友太郎・吉澤一家・佐野勲・宮崎淳一. (2017) 淡水貝類を用いた水質浄化方法の開発. 日本動物学会第 88 回大会.
- [2] 保坂友太郎・吉澤一家・佐野勲・宮崎淳一. (2018) 淡水貝類を用いた水質浄化方法 の開発 II. 平成 29 年度衛生環境研究所研究成果発表会.

後者は、助成期間中に以下の学会・研究発表会で発表した。

- [3] 佐野勲・白井亮久・近藤高貴・保坂友太郎・宮崎淳一. (2017) 日本に生息するイシガイ目二枚貝類の分子系統学的解析. 日本動物学会第 88 回大会.
- [4] 佐野勲・白井亮久・近藤高貴・宮崎淳一. (2017) ミトコンドリア 16S rRNA と COI に基づく日本産イシガイ類の分子系統学的解析. 淡水貝類研究会第 23 回研究集会.
- [5] 梅本健琉・阿部晟大・松崎拓実・松井良太・佐野勲・宮崎淳一. (2018) 淀川河道内氾濫原におけるイシガイ科の生息状況. 2017 年度軟体動物多様性学会.
- [6] 佐野勲・白井亮久・近藤高貴・保坂友太郎・宮崎淳一. (2018) ミトコンドリア 16S rDNA と COI に基づく日本産イシガイ類の系統関係. 平成 29 年度衛生環境研究所研究成果発表会.

現在、本研究で得られた成果をもとに論文執筆を進めており、近く国際誌に投稿する予定である。さらに、淡水貝類の遺伝情報は、DDBJ などの公共機関に登録することで社会に発信していく。また、本研究で得られた成果は今後も、大学の授業、講演会、研究室のホームページ (<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~miyazaki/>) などを通じて積極的に発信していく。

8. 引用文献

- [1] Heard, W.H. and Guckert, R.H. (1970) A Re-Evaluation of the Recent Unionacea (Pelecypoda) of North America. *Malacologia*, 10, 333-355.
- [2] Hirano, T., Saito, T., & Chiba, S. (2015) Phylogeny of freshwater viviparid snails in Japan. *Journal of Molluscan Studies*, 81, 435-441.
- [3] 紀平肇, 松田征也, 内山りゅう. (2003) 日本産淡水貝類図鑑 ①琵琶湖・淀川産の淡水貝類. ピーシーズ, 東京, 159 pp.
- [4] Kimura, M. (1980) A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- [5] Kondo, T. (1997) Taxonomic Position and Distribution of *Unio biwae* (Bivalvia: Unionidae). *Japanese Journal of Malacology*, 56, 41-47.
- [6] 近藤高貴. (2015) 近藤高貴コレクション 日本産イシガイ目標本目録. 大阪教育大学, 58 pp.
- [7] Lopes-Lima, M., Froufe, E., Ghamizi, M., Mock, K.E., Kebapci, ü., Klishko, O., *et al.* (2017) Phylogeny of the Most Species-Rich Freshwater Bivalve Family (Bivalvia: Unionida: Unionidae): Defining Modern Subfamilies and Tribes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106, 174-191.
- [8] Rosenberg, G., Kuncio, G.S., Davis, G.M. and Harasewyeh, M.G. (1994) Preliminary Ribosomal RNA Phylogeny of Gastropod and Unionoidean Bivalve Molluscs. *The Nautilus*, Suppl. 2, 111-121.
- [9] 白井亮久. (2009) 日本産淡水生二枚貝 (イシガイ目) の分子系統学的研究. 千葉大学学位申請論文.
- [10] Takeuchi, M., Okada, A. and Kakino, W. (2015) Phylogenetic Relationships of Two Freshwater Pearl Mussels, *Margaritifera laevis* (Haas, 1910) and *Margaritifera togakushiensis* Kondo and Kobayashi, 2005 (Bivalvia: Margaritiferidae), in the Japanese Archipelago. *Molluscan Research*, 35, 218-226.

9. 図表

Table 1 淡水貝類の浄化効率 FR。3 回の実験の平均と標準誤差を示す。橙色は高い浄化効率 (0.10~0.19)、赤色は特に高い浄化効率 (0.20 以上) を示す。

		大型ヌマガイ	中型ヌマガイ	小型ヌマガイ	ヨコハマシジラガイ	山中湖タテボシガイ	河口湖タテボシガイ	ヒメタニシ	カワシジユガイ	河口湖カラスガイ	山中湖カラスガイ	セタシジミ	イケチョウガイ	カワニナ
室温	4μm	0.09±0.03		0.08±0.00	0.08±0.02	0.05±0.02	0.04±0.03	0.07±0.02	0.05±0.02	0.03±0.01	0.02±0.01	0.09±0.00	0.02±0.01	0.05±0.01
	2μm	0.12±0.03		0.10±0.01	0.10±0.01	0.12±0.02	0.17±0.04	0.07±0.02	0.07±0.04	0.04±0.01	0.04±0.01	0.06±0.00	0.05±0.01	0.03±0.01
	0.2μm	0.14±0.09		0.13±0.04	0.10±0.08	0.12±0.05	0.09±0.05	0.15±0.00	0.02±0.05	0.02±0.01	0.03±0.01	0.08±0.00	0.03±0.02	0.01±0.02
低水温 (10°C)	4μm		0.00±0.00		0.10±0.02	0.08±0.00		0.02±0.01			0.01±0.00	0.02±0.00		
	2μm		0.00±0.00		0.06±0.03	0.02±0.00		0.00±0.01			0.01±0.00	0.02±0.00		
	0.2μm		0.01±0.00		0.07±0.03	0.03±0.02		0.02±0.00			0.01±0.00	0.04±0.00		
高水温 (30°C)	4μm		0.20±0.00		0.11±0.01	0.12±0.03		0.16±0.01			0.03±0.00	0.09±0.00		
	2μm		0.08±0.01		0.14±0.02	0.10±0.00		0.11±0.00			0.01±0.00	0.06±0.00		
	0.2μm		0.12±0.01		0.24±0.01	0.14±0.02		0.15±0.01			0.03±0.00	0.09±0.00		
クロレラ	遮光あり				0.35±0.04	0.29±0.00								
	遮光なし				0.54±0.00	0.26±0.00								
大型水槽	4μm		0.04±0.01		0.06±0.01	0.04±0.01		0.08±0.02				0.05±0.01		
	2μm		0.02±0.01		0.04±0.00	0.08±0.02		0.11±0.02				0.09±0.01		
	0.2μm		0.03±0.00		0.03±0.03	0.13±0.01		0.07±0.01				0.04±0.01		

Table 2 各閉鎖区画の設定条件。

Co	対照実験用に何も入れない区画
A	カゴにタテボシガイ50個体入れた区画
B	網にタテボシガイ100個体入れた区画
C	網にタテボシガイ50個体入れ、水草と同伴させた区画
D	網にタテボシガイ50個体入れた区画
PG	凝集剤(ポリグルタミン酸)を導入した区画

Figure 1 各閉鎖区画の濁度変化。2016年5月に設置してから2017年7月までの1ヶ月ごとの濁度変化を示す。

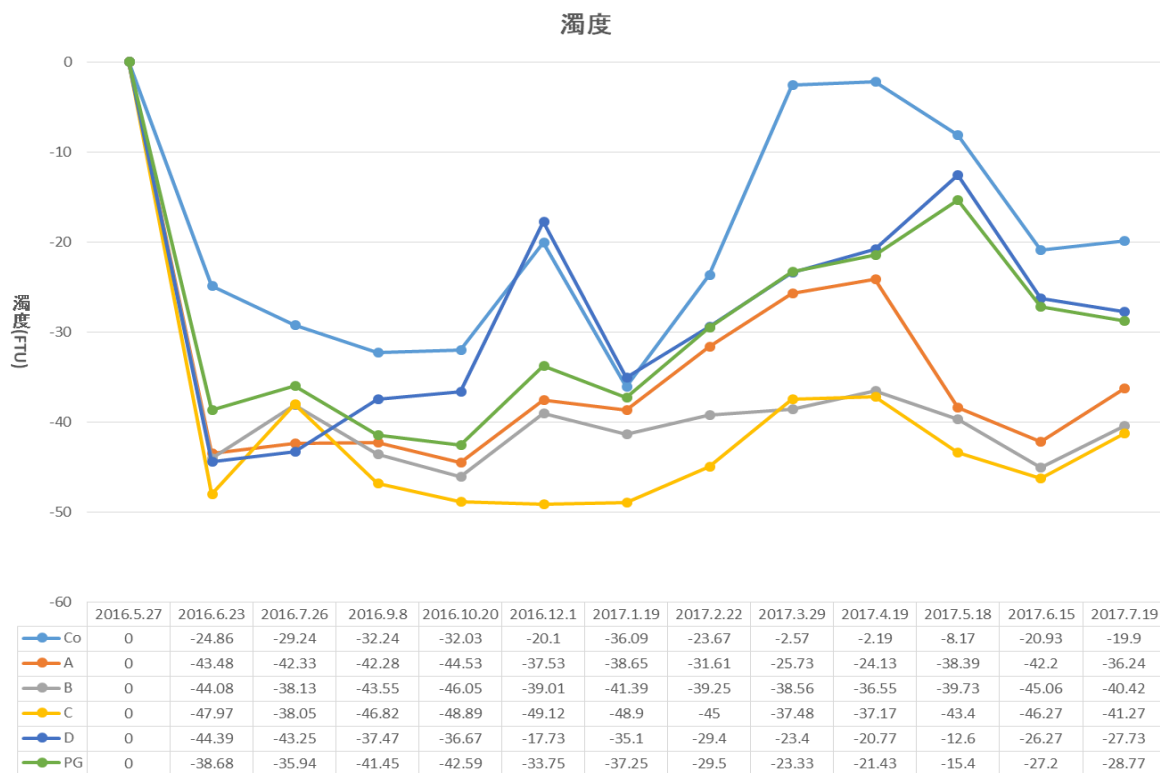


Figure 2 各閉鎖区画の透視度変化。2016年5月に設置してから2017年7月までの1ヶ月ごとの透視度変化を示す。

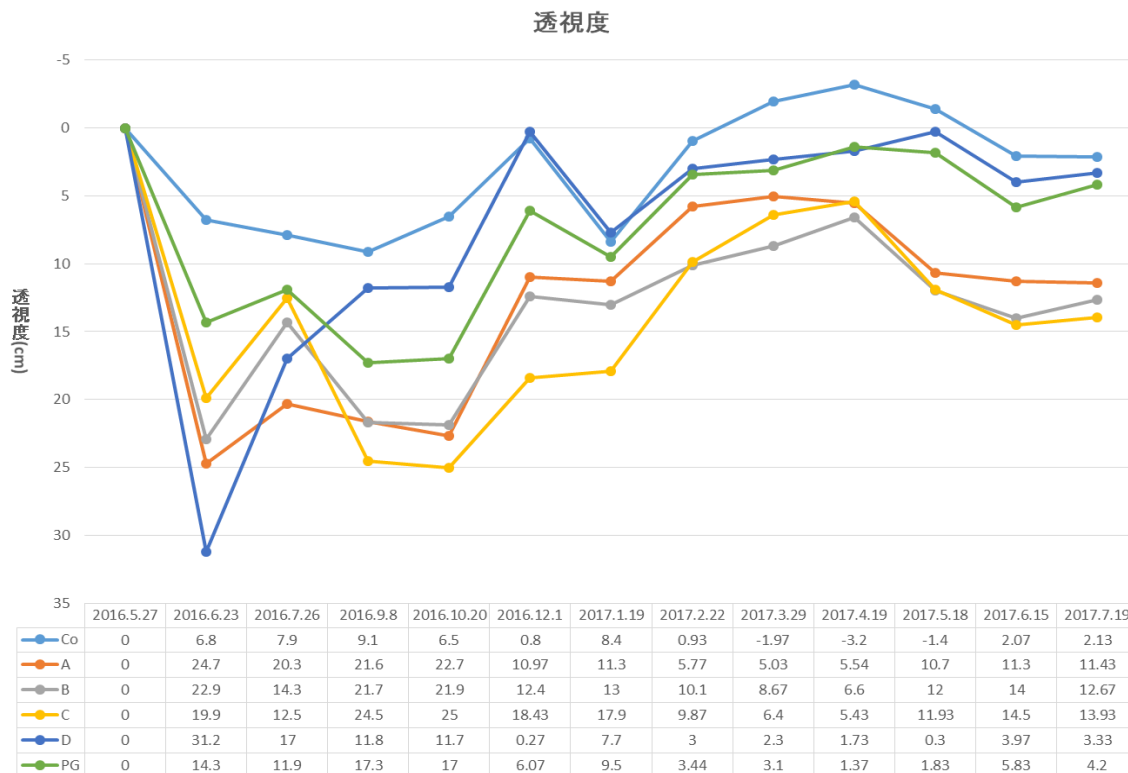


Figure 3 各閉鎖区画の成長量。2016年5月から2017年4月までの3ヶ月ごとの測定結果を示す。

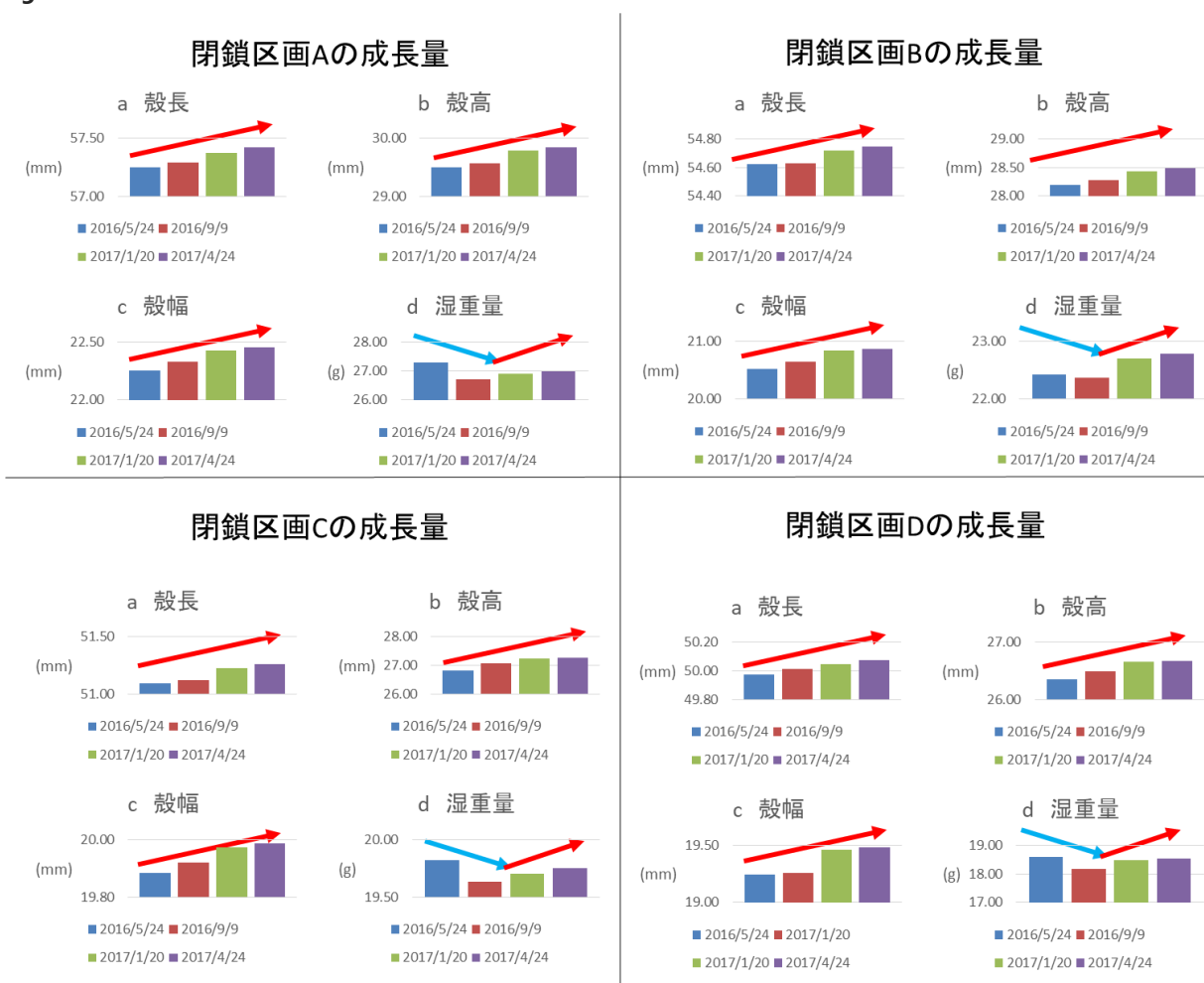


Figure 4 ミトコンドリア16S rRNA遺伝子の塩基配列 (321 bp) に基づき構築した日本産イシガイ類の系統樹。アウトグループには、*Neotrigonia*を用いた。各分岐点にある数字は、信頼度 (NJ/MP/BI) を示す。スケールは、1塩基あたり0.05置換していることを示す。

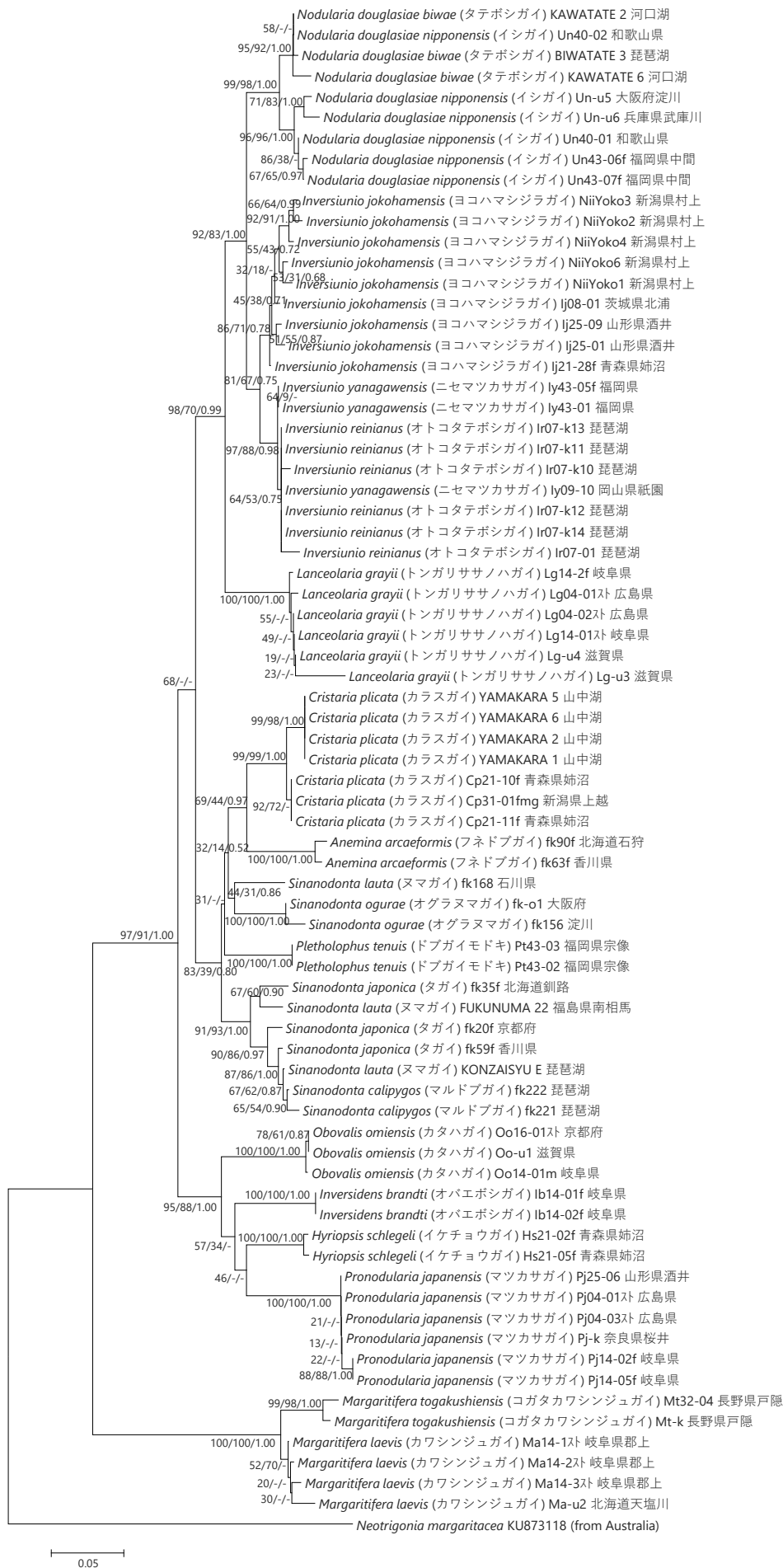
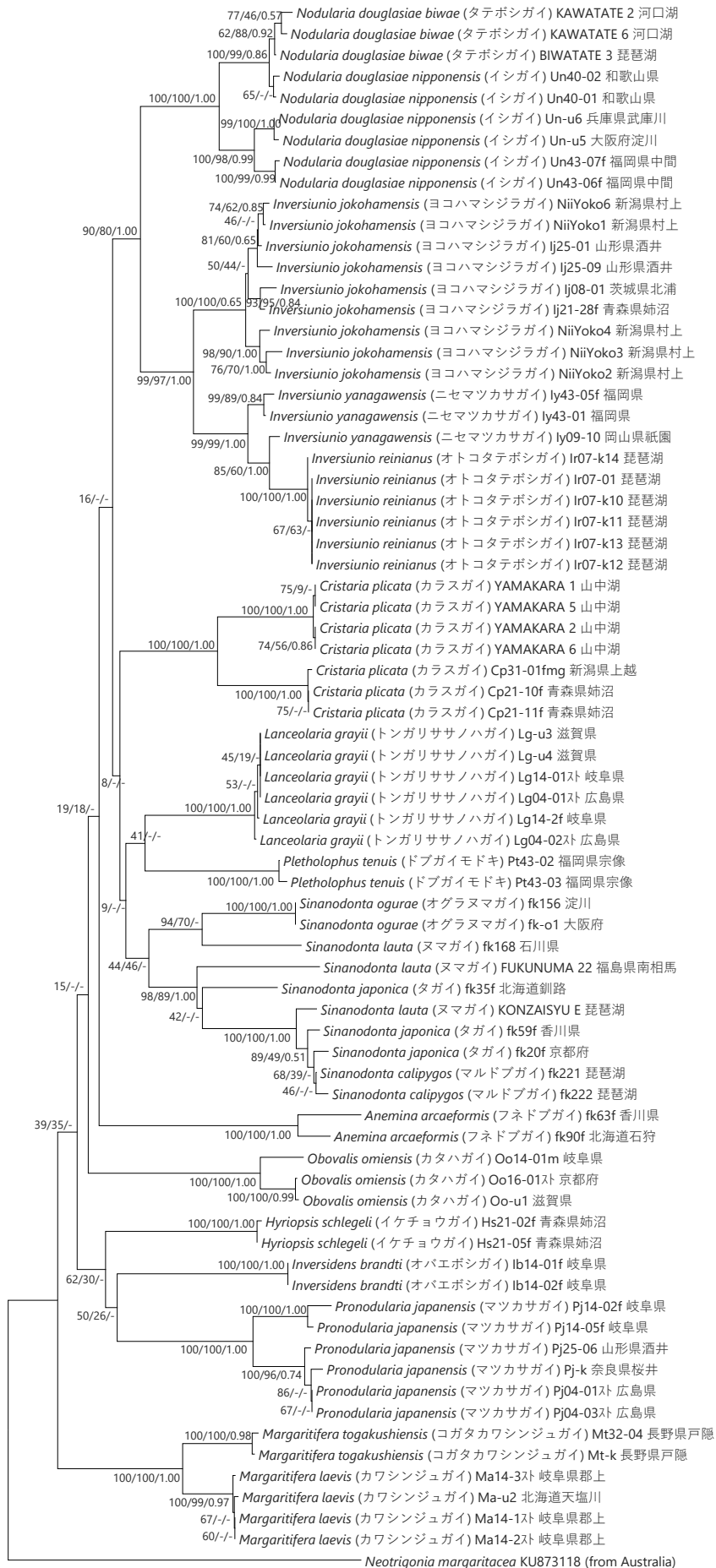


Figure 5 ミトコンドリアCOI遺伝子の塩基配列 (539 bp) に基づき構築した日本産イシガイ類の系統樹。アウトグループには、*Neotrigonia*を用いた。各分岐点にある数字は、信頼度 (NJ/MP/BI) を示す。スケールは、1塩基あたり0.02置換していることを示す。



0.02

Figure 6 ミトコンドリア16S rRNAとCOI遺伝子の塩基配列 (860 bp) に基づき構築した日本産イシガイ類の合体系統樹。アウトグループには、*Neotrigonia*を用いた。各分岐点にある数字は、信頼度 (NJ/MP/BI) を示す。スケールは、1塩基あたり0.05置換していることを示す。

