

## 山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関 山梨大学大学院 教育学研究科 教科教育専攻

職名・氏名 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 研究の方法

### 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 $\mu\text{m}$ ）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 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ ）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緑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、カワシンジュガイ、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。

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 $\mu\text{g}$ ）からDNAを抽出したのち、ミトコンドリアDNAの16S rRNA領域（約460bp）及びCOI領域（約550bp）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。

### 留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

## 4 研究の成果

### ① 淡水貝類を用いた水質浄化法の開発

水槽実験では、いずれの二枚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。

野外実験では、全ての閉鎖区画で濁度低下および透視度の上昇が見られた。貝を入れた区画は、ほとんどの場合で凝集剤を用いた区画より濁度は低く、透視度は高くなった。全ての区画で貝の平均殻長、平均殻高、平均殻幅は増加した。これは導入したタテボシガイが池内の懸濁粒子を摂食して成長していることを示している。これらの結果は淡水貝類による水質浄化が効果的であることを示唆した。

### 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。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。16S rRNA 遺伝子の系統樹と COI 遺伝子の系統樹は大筋で一致したが、一部で異なる系統関係が示された。また、COI 遺伝子の系統樹は、樹形の信頼性も低かった。そこで、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。その結果、1) 日本国内のイシガイ目は、近藤 (2015) のカワシンジュガイ科とイシガイ科に相当する 2 群に分けられた、2) イシガイ科は、近藤 (2015) のイシガイ亜科とニシウネヌマガイ亜科に相当する 2 群に分けられた、3) イシガイ亜科は、さらに 2 群に分けられた、4) 近藤 (2015) の 12 属は、すべて単系統群を形成し、いずれも高い信頼性をもって支持された、5) 近藤 (2015) の 18 種は、ニセマツカサガイ、ヌマガイ、タガイを除き、すべて単系統群を形成し、いずれも高い信頼性をもって支持された、6) 紀平ら (2003) のタテボシガイは単系統群を形成したが、紀平ら (2003) のイシガイは単系統群を形成せず、一方イシガイ + タテボシガイは単系統群を形成し、高い信頼性をもって支持された。

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。

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。

### 留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

## 5 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

淡水貝類は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二枚貝類を産卵床としており、各々の種が特定の二枚貝を選択することが知られ、非常に密接な共生関係を築いている。各々の地域集団・個体群の遺伝的な関係を明らかにすることで、淡水二枚貝類とタナゴ類の間で共進化が起こっているか否かを解明する。

## 6 研究成果の発信方法（予定を含む）

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。

### 留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。