

# ヒメミカヅキモ (*Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex) における交配群 II-C の再発見

小林 弘佳<sup>1</sup>・関本 弘之<sup>1,2</sup>・土金 勇樹<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 日本女子大学大学院理学研究科物質・生物機能科学専攻 (〒112-8681 東京都文京区目白台 2-8-1)

<sup>2</sup> 日本女子大学理学部物質生物科学科 (現: 化学生命科学科) (〒112-8681 東京都文京区目白台 2-8-1)

<sup>3</sup> 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Hiroka Kobayashi<sup>1</sup>, Hiroyuki Sekimoto<sup>1,2</sup> and Yuki Tsuchikane<sup>2,3\*</sup>: Rediscovered mating group II-C of *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 70: 117–123, July 10, 2022

*Closterium peracerosum-strigosum-littorale* (*C. psl.*) complex is a unicellular zygnematophycean alga. At least seven reproductively isolated mating groups have been reported and studied. However, only four groups (II-A, II-B, I-E, and G) were available for the analysis of reproductive isolation, because three groups (II-C, I-D, and I-F) had not been maintained in a fertile state. In this study, we analyzed eight clonal strains of *C. psl.* complex, which were isolated and established from Lake Inba (Chiba, Japan). Phylogenetic analysis suggested that four of them (Inba1-3, 9, 12, and 20) belonged to the clade of mating group II-C. Crossing experiments between these strains and NIES-261 (an mt<sup>+</sup> strain of group II-C) revealed that they were fertile. It also revealed that Inba1-12 was mt<sup>-</sup> and Inba1-20 was mt<sup>+</sup> because NIES-261 made zygospore with Inba1-12 but not with Inba1-20. Further experiments using the strains, Inba1-12 (mt<sup>-</sup>) and 20 (mt<sup>+</sup>), suggested that they were completely reproductively isolated from the existing mating groups (II-A, II-B, I-E, and G). Since the mt<sup>-</sup> strains of group II-C had not been maintained anywhere, the restoration of fertile group II-C will be useful for the deep consideration of reproductive isolation and speciation in the *C. psl.* complex.

*Key Index Words:* fresh water algae, *Closterium*, mating group, reproductive isolation, sexual reproduction, speciation

<sup>1</sup>Division of Material and Biological Sciences, Graduate School of Science, Japan Women's University, 2-8-1 Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8681, Japan

<sup>2</sup>Department of Chemical and Biological Sciences, Faculty of Science, Japan Women's University, 2-8-1 Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8681, Japan

<sup>3</sup>Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

\* Author for correspondence: tsuchikaneyuki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

## 緒言

生殖隔離の進行は、種分化において重要な役割を果たす。種分化機構を理解するために、様々な生物種を用いて生殖隔離障壁に関する研究が行われている (Widmer *et al.* 2009)。単細胞藻類のヒメミカヅキモ (*Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex) においても、生殖隔離に関する研究が進められてきた (土金 2017)。ヒメミカヅキモは、ストレプト植物門ホシミドロ藻綱チリモ目に属しており (Adl *et al.* 2019)、陸上植物に最も近縁な藻類の一つであると示唆されている (Wickett *et al.* 2014)。ヒメミカヅキモは、実験室での有性生殖誘起が容易であり、その過程や性フェロモン分子についての研究が進んでいる。また、交配群という生殖的に隔離されたグループが複数存在するため、生殖隔離障壁の解析に適している。さらに、遺伝子組換えによる形質転換系が確立され (Abe *et al.* 2011, Kawai *et al.* 2022)、CRISPR/Cas9 による遺

伝子破壊も可能であることから (Kanda *et al.* 2017)、ストレプト植物の有性生殖を研究するためのモデル生物となりつつある (Tsuchikane & Sekimoto 2019)。

接合と呼ばれる有性生殖を行うミカヅキモ属 (*Closterium*) には、ホモタリズム、ヘテロタリズムと呼ばれる生殖様式が知られる。ヒメミカヅキモにおいても、それぞれの生殖様式を示し、遺伝的に分化したホモタリズム系統とヘテロタリズム系統が存在する (Tsuchikane *et al.* 2010)。ホモタリズム系統は 1 細胞由来のクローン細胞の間で接合し、自家和合を行う。一方、ヘテロタリズム系統は自家不和合であり、+ 型と - 型と呼ばれる 2 つの性 (接合型) を示す系統で構成される。この + 型と - 型の細胞の間で接合が行われる (Tsuchikane & Sekimoto 2019)。これらの系統は細胞分裂 (無性生殖) による増殖を行うが、窒素源を含まない接合誘導培地 (MI 培地; Ichimura 1971) で培養することで、接合の誘導が可能であ

る (Ichimura 1971)。ヘテロタリズム系統の接合過程では、+型と-型の両細胞がそれぞれ細胞分裂 (有性分裂) を行って配偶子嚢細胞を形成し、ペア形成、プロトプラスト (配偶子) 放出を経て、最終的に接合子を形成する。この接合過程の制御には、2種類の糖タンパク質性の性フェロモン (PRIP と PR-IP Inducer) が関与している (Sekimoto *et al.* 1990, 1993, 1994, Tsuchikane *et al.* 2005, Akatsuka *et al.* 2006)。

ヘテロタリズム系統のヒメミカヅキモには、生殖的に隔離されたグループ (交配群) が存在しており、これまでに7つ (交配群 II-A, II-B, II-C, ID, IE, IF, G) が報告されている (Watanabe 1977, Watanabe & Ichimura 1978, Tsuchikane *et al.* 2018b)。これらに見られる生殖隔離の原因は、交配群間で性フェロモンの相互認識が失われたことが原因であると示唆されている (Tsuchikane *et al.* 2008)。ヒメミカヅキモにおける生殖隔離の実態を明らかにするためには、それぞれの交配群の間において交配を試みることで接合の有無を確認する必要がある。そして接合前隔離が観察されるのであれば、接合過程のどの段階で生殖隔離障壁があるのかといった生殖隔離の程度と、性フェロモンの作用・構造との関係を比較する必要がある。

ヒメミカヅキモの7つの交配群のうち、交配群 IF として報告された株 (M-10-21 と M-10-25 : Ichimura 1973, Watanabe 1977) は、系統保存施設に保存されていない。また、交配群 II-C と ID は、系統保存施設にある株を掛け合わせても有性生殖が誘起できず、分子系統解析の結果から II-C の-型とされていた株 (NIES-55) は交配群 II-A のクレードに含まれること、交配群 ID とされていた株の+株と-型が異なるクレードに属したことから、保存の間に株の取り違えが生じたことが示されている (Tsuchikane *et al.* 2018b)。そのため、+型と-型の両株が保存されていて実験室での有性生殖誘起が可能な交配群は、II-A, II-B, IE, G の4群のみであり、より多くの交配群を入手する必要がある。

本研究では、ヒメミカヅキモの生殖隔離機構の解析のために、新規交配群あるいは既知の交配群のうち現存する株の有性生殖誘起が不可能になっていた交配群 II-C と ID を得ることを目的とした。フィールドでの調査を進めていたところ、千葉県印旛沼でヒメミカヅキモとみられる細胞を複数検出した。本研究では、これらからクローン株を確立し、分子系統解析、交配試験、形態の計測を行うことにより、印旛沼から得られた株の交配群、有性生殖誘起の可否、接合型、既存の交配群との形態の違い等の特徴を明らかにした。

## 材料と方法

### サンプルの採集と株の単離

本研究で使用したミカヅキモの株を Table 1 に示した。2016年6月25日、千葉県の印旛沼 (鹿島川との接合部 : 35°44'30.2"N 140°12'08.2"E) において、プランクトンネット (目合 32  $\mu\text{m}$ , 離合社, 東京) を用いて濃縮した水サンプル (Inba1) を採集した。当日現地の水温は 24.7°C, pH は

8.1 であった。ミカヅキモ属とみられる細胞をピペット洗浄法 (Pringsheim 1946, Tsuchikane *et al.* 2018a) により1細胞ずつ単離・洗浄した。細胞分裂によるクローン培養株を確立するため、Abe *et al.* (2011) の方法に従い、CA 培地 (Kasai *et al.* 2004) を基礎とした調製培地 (Conditioned medium) を作製した。単離した細胞は、15 mL の調製培地が入った試験管 (直径 18 mm, 長さ 150 mm) の中で、23°C, 16 時間明期, 8 時間暗期の条件下で培養をした。培養に用いる光源は、インキュベーター内の LED ライト (LT30C, ビームテック, 埼玉) を使用し、培地表面における光量は 55  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  であった。

### 分子系統解析

分子系統解析用の DNA を抽出するために、水サンプル (Inba1) から単離し試験管内で培養した細胞を、150 mL の CA 培地を分注した 300 mL 三角フラスコへ移し、前述の条件下で大量に増殖させた。あわせて、同一の水サンプル (Inba1) から既に単離されていたヒメミカヅキモと思われる7つの系統株 (Inba1-1, Inba1-3, Inba1-6, Inba1-9, Inba1-10, Inba1-12, Inba1-13; Tsuchikane *et al.* 2018a) についても同様に増殖させた。

増殖させた細胞の DNA 抽出、18S rDNA 領域の 1506 group I intron 配列の増幅とダイレクトシーケンス、分子系統解析は Tsuchikane *et al.* (2018b) に記載された方法に従って行った。配列のアライメントは MAFFT (Katoh *et al.* 2019) を用いて行い、ギャップがみられる列は手で除いた。系統解析に用いたアライメントマトリックスは、これまでに報告された5つの交配群 (II-A, II-B, II-C, IE, G) より得られた17配列に今回得た8配列を加えたものである (Table 1)。系統樹の外群としてオオミカヅキモ (*C. ehrenbergii* Meneghini ex Ralfs) の 1506 group I intron 配列 (AY148821) を用いた。また、同一の配列は一つの OTU (Operational Taxonomic Unit) として扱った。

### 有性生殖の誘起と交配試験

14日間培養したヒメミカヅキモの栄養細胞を 50 mL 遠心チューブに回収し、遠心分離 (3000 rpm, 3 min, 23°C) を行った後、上清を捨てた。次に、接合誘導培地である MI 培地を 10 mL 加えて細胞を懸濁し、遠心分離 (3000 rpm, 3 min, 23°C) の後に上清を捨てる操作を3回繰り返す。最後に 5 mL の MI 培地に細胞を加えて懸濁した。この細胞懸濁液は、プランクトン計算盤 (MPC-200, 松浪硝子工業, 大阪) を用いて、倒立顕微鏡 (CK40, OLYMPUS, 東京) 下で細胞数を見積もった。交配試験では、交配を試みる2つの系統株をそれぞれ1万細胞ずつ24穴プレート (直径 16 mm, IWAKI, 千葉) に添加し、総液量が 2 mL になるよう MI 培地を加えた。また、2 mL の MI 培地に単独の系統が 2 万細胞含まれるものを対照試験とした。そして、23°C のインキュベーター内において連続光で 72 時間培養した後、12.5% グルタルアルデヒドを 100  $\mu\text{L}$  添加して固定し、生殖反応の有無を観察した。こ

Table 1. List of *Closterium peracerosum-strigosum-littolale* complex strains used in this study.

Strain designation	Locality	Mating type	Mating group	Accession No.	Total length of the 1506 group I intron (bp)
NIES-53 <sup>a,b</sup>	Ibaraki, Japan	+	II-A	AB363682	534
NIES-54 <sup>a,b</sup>	Ibaraki, Japan	-	II-A	AB363683	534
NIES-58 <sup>a,b</sup>	Ibaraki, Japan	-	II-A	AB363684	534
NIES-59 <sup>a,b</sup>	Ibaraki, Japan	+	II-A	AB363685	534
NIES-62 <sup>a,b</sup>	Ibaraki, Japan	+	II-A	AB625558	534
NIES-63 <sup>a,b</sup>	Ibaraki, Japan	-	II-A	AB625559	534
NIES-60 <sup>a,b</sup>	Ibaraki, Japan	+	II-B	AB625557	534
NIES-61 <sup>a,b</sup>	Ibaraki, Japan	-	II-B	AB625556	534
NIES-64 <sup>a,b</sup>	Ibaraki, Japan	-	II-B	AB363686	534
NIES-65 <sup>a,b</sup>	Ibaraki, Japan	+	II-B	AB363687	534
NIES-69 <sup>a,b</sup>	Chiba, Japan	+	II-B	AB363688	534
NIES-70 <sup>a,b</sup>	Chiba, Japan	-	II-B	AB363689	534
NIES-67 <sup>a,c</sup>	Damchan, Nepal	+	I-E <sup>d</sup>	AB363691	514
NIES-68 <sup>a,c</sup>	Damchan, Nepal	-	I-E <sup>d</sup>	AB363692	514
NIES-4319 (ASA13-14) <sup>e</sup>	Shizuoka, Japan	-	G	LC361439	526
NIES-4320 (ASA13-21) <sup>e</sup>	Shizuoka, Japan	+	G	LC361440	526
NIES-261 <sup>a,b</sup>	Ibaraki, Japan	+	II-C	AB363690	565
Inba1-12 (NIES-4321) <sup>f</sup>	Chiba, Japan	-	II-C	LC685248 <sup>h</sup>	562
Inba1-20 (NIES-4322) <sup>g</sup>	Chiba, Japan	+	II-C	LC685247 <sup>h</sup>	562
Inba1-3 <sup>f</sup>	Chiba, Japan	-	II-C	LC685249 <sup>h</sup>	562
Inba1-9 <sup>f</sup>	Chiba, Japan	-	II-C	LC685250 <sup>h</sup>	562
Inba1-1 <sup>f</sup>	Chiba, Japan	n.a.	II-B	LC685254 <sup>h</sup>	534
Inba1-10 <sup>f</sup>	Chiba, Japan	n.a.	II-B	LC685253 <sup>h</sup>	534
Inba1-6 <sup>f</sup>	Chiba, Japan	n.a.	G	LC685251 <sup>h</sup>	526
Inba1-13 <sup>f</sup>	Chiba, Japan	n.a.	G	LC685252 <sup>h</sup>	526

<sup>a</sup>Strains obtained from the National Institute for Environmental Studies (NIES; Ibaraki, Japan)

<sup>b</sup>Watanabe & Ichimura (1978)

<sup>c</sup>Ichimura (1973)

<sup>d</sup>Mating group I-E is denoted as IB in NIES

<sup>e</sup>Tsuchikane *et al.* (2018b)

<sup>f</sup>Tsuchikane *et al.* (2018a)

<sup>g</sup>Strains established in this work.

<sup>h</sup>Sequences obtained in this work.

n.a., not analyzed

ここでは2回の反復試験を行った。接合子形成率を求める際は、細胞懸濁液を混合して細胞数密度を均一にしたうえで一部をプランクトン計算盤にとり、顕微鏡下で細胞をカウントした。計算式は、接合子形成率 (%) = {接合子の数 × 2 / (全栄養細胞 + 接合子の数 × 2)} × 100 とした。反復試験を3回行い、平均値と標準誤差を示した。

#### 形態的特徴の測定

単離した Inba1-12 と Inba1-20、および NIES-261 について形態的特徴を記録し、既存のヒメミカヅキモ交配群の株と比較するため、細胞の長さと同幅を測定した。測定には、10日間培養した Inba1-12 と Inba1-20 の栄養細胞を用いた。倒立顕微鏡 (BIO REVO, キーエンス, 東京) で写真を撮影し、その写真をもとに50個体の細胞の長さと同幅を測定し、平均と標準誤差を求めた。

#### 結果と考察

##### 印旛沼から得られた株の分子系統解析

印旛沼から採集した水サンプルから Inba1-20 を確立した。

この株と、すでに単離されていたヒメミカヅキモと思われる7つの系統株 (Inba1-1, Inba1-3, Inba1-6, Inba1-9, Inba1-10, Inba1-12, Inba1-13; Tsuchikane *et al.* 2018a) 計8株について、1506 group I intron 配列を用いた分子系統解析を行った。各系統株の1506 group I intron の配列長は Table 1 に示したとおりであり、分子系統解析に用いたアラインメントマトリックス長は427 bpであった。解析の結果、Inba1-3, Inba1-9, Inba1-12, Inba1-20 が交配群 II-C の + 型 (NIES-261) と単系統群を形成した (Bayes 事後確率は1.00, NJ法およびMP法のブートストラップ値は共に100%)。また、Inba1-1 と Inba1-10 は交配群 II-B, Inba1-6 と Inba1-13 は交配群 G の株の1506 group I intron 配列とそれぞれ一致した (Fig. 1) なお、Fig. 1 の系統樹で同一 OTU として扱っている株の1506 group I intron 配列は、アラインメントの前の状態で100%一致していた。

##### 印旛沼産交配群 II-C 株の接合型と生殖隔離状況

交配群 II-C の株と単系統を形成した印旛沼産の株 (Inba1-3, Inba1-9, Inba1-12, Inba1-20) について、接合子形成の可否と接合型を明らかにするため、交配群 II-C の + 型 (NIES-



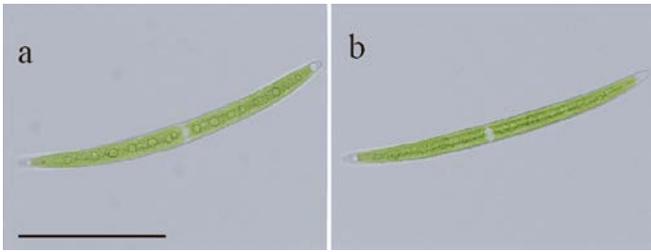


Fig. 2. Vegetative cells of mating group II-C, established in this study. (a) Inba1-12, (b) Inba1-20. Scale bar: 100  $\mu$ m.

Inba1-12 と Inba1-20 では接合子形成が見られたのに対して、これらの株と他の交配群の株の間ではいずれも全く生殖反応がみられず、接合子を形成することは無かった (Table 3)。したがって、Inba1-12 と Inba1-20 は他の交配群から生殖的に隔離されていることが示された。なお、Inba1-12 と Inba1-20 の接合子形成率を求めたところ、 $9.4 \pm 2.7\%$  ( $n = 3$ ) であった。

過去の研究により、ヒメミカヅキモの交配群間の生殖隔離状況が明らかにされてきた。交配群 II-A と II-B は近縁で、交配試験の結果 (Table 3) でも示されたように、交配群 II-A の + 型 (NIES-53) と、交配群 II-B の - 型 (NIES-64) は接合子を形成することができる。一方、その逆の組み合わせでは接合子を形成せず、不完全な生殖隔離が存在する (Watanabe & Ichimura 1978, Tsuchikane *et al.* 2008)。交配群 I-E と G 間では、接合子を形成しないものの、交配群 I-E の + 型と交配群 G の - 型を混合すると、交配群 G の - 型がペアをつくらず単独でプロトプラスト (配偶子) を放出するという不完全な生殖反応を示す (Tsuchikane *et al.* 2018b)。このことから交配群 I-E と G 間の生殖隔離の程度は、II-A と II-B 間よりも大きいと考えられる。交配群間の生殖隔離の程度は、系統的な距離と相関があることが示唆されている (Tsuchikane *et al.* 2008)。本研究で得られた交配群 II-C においても、系統的に離れた交配群 II-A, II-B, I-E, G とは生殖隔離しており、系統樹 (Fig. 1) と矛盾しない結果を示した。

#### 交配群 II-C の形態的特徴

ヒメミカヅキモの各交配群の形態的特徴はほぼ同一であるものの、一部の交配群間では細胞の長さや幅に違いがあることが示されていた (Watanabe & Ichimura 1978)。そのため、新たに得られた交配群 II-C (Inba1-12, Inba1-20) と既存の交配群 II-C の + 株 (NIES-261) の長さや幅を測定して、Tsuchikane *et al.* (2018b) で測定された交配群 I-E と G の特徴と比較した (Fig. 3)。その結果、近縁な関係にある交配群 I-E と交配群 G では、細胞のサイズが近いが、これらと生殖隔離していて系統樹 (Fig. 1) 上でも離れた関係にある交配群 II-C の系統保存株 (NIES-261) および Inba1-12 と Inba1-20 は細胞のサイズが交配群 I-E や G よりも大きいという特徴が示された。

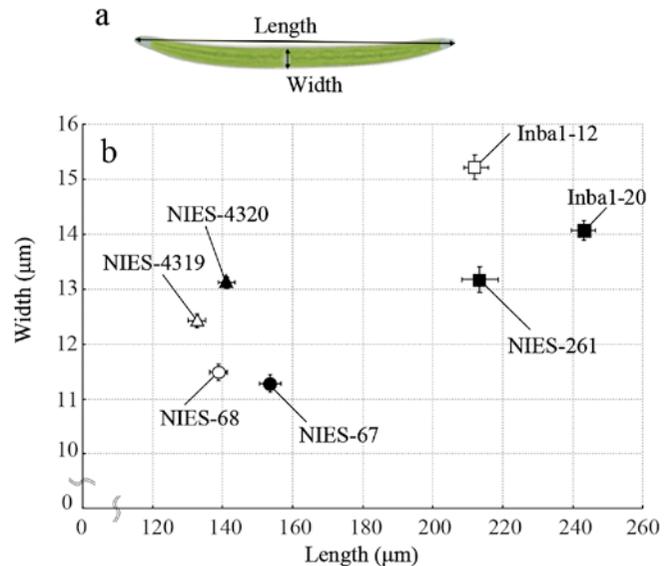


Fig. 3. Graphic analysis of width and length variation among the strains of mating group I-E, G, and II-C. (a) Scheme of morphological characters (b) Mean values of each strain in width and length. Symbols: triangles; group G, circles; group I-E, squares; group II-C, closed symbols; mt<sup>+</sup>, and open symbols; mt<sup>-</sup>. Horizontal lines and Vertical lines depict standard errors of length and width respectively ( $n = 50$ ). The data for the mating groups I-E and G were from Tsuchikane *et al.* (2018b).

#### 交配群 II-C 発見の意義と今後の展望

系統保存施設にある交配群 II-C は有性生殖が誘起できず、- 型とされていた株 (NIES-55) の 1506 group I intron 配列は交配群 II-A の株のもものと一致したことから、保存の間に株の取り違えが生じたことが示されている (Tsuchikane *et al.* 2018b)。本研究により、現存する交配群 II-A, II-B, I-E, G に加え、有性生殖誘起が可能な交配群 II-C の株を複数獲得したことにより、生殖隔離の程度が異なる 5 つのヒメミカヅキモの交配群の両性を揃えることができた。本研究で得られた交配群 II-C のうち 2 株 (Inba1-12, Inba1-20) は国立環境研究所微生物系統保存施設に寄託し、それぞれ NIES-4321, NIES-4322 という番号で登録されている。今後、これらの株を用いることができ、生殖隔離の状況と性フェロモンの配列比較などを通して、ヒメミカヅキモにおける生殖隔離機構の更なる解明が期待される。また、Watanabe & Ichimura (1978) 以来、交配群 II-C の採集報告が無いため、今回の印旛沼の株は約 40 年ぶりの再発見となった。

ヒメミカヅキモでは、同一の湖沼や水田等から得られた複数の交配群の間では、完全な生殖隔離がみられ (市村 1982)、交配群 II-A と II-B, I-E と G のような不完全な生殖隔離を示す組み合わせの交配群が同所から発見されたという報告はない。同属のオオミカヅキモでも同様の報告がされている (市村 1982)。本研究の印旛沼産ヒメミカヅキモでも互いに完全に生殖隔離している関係にある交配群 II-B, II-C, G のみが得られた。この原因の一つとして、交配群間に繁殖干渉 (Gröning

Table 3. Intercrosses between strains of the *C. psil* complex.

		Mating group II-C			Mating group II-A		Mating group II-B		Mating group I-E		Mating group G				
		Inba1-12	Inba1-20	NIES-261	NIES-53	NIES-54	NIES-65	NIES-64	NIES-67	NIES-68	NIES-4320	NIES-4319			
Mating group II-C	Inba1-12	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
	Inba1-20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	NIES-261			-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Mating group II-A	NIES-53				-	+	- <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sub>b</sub>	- <sub>b</sub>			
	NIES-54						-	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sub>b</sub>	- <sub>b</sub>		
Mating group II-B	NIES-65							-	+	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sub>b</sub>	- <sub>b</sub>		
	NIES-64									-	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sub>b</sub>	- <sub>b</sub>	
Mating group I-E	NIES-67										-	+	- <sub>b</sub>	- <sub>b</sub>	
	NIES-68												-	- <sub>b</sub>	
Mating group G	NIES-4320													-	+
	NIES-4319														-

"+"; zygospor formation was observed, "-" ; no zygospor formation was observed.

The results marked with a and b are untested combinations in this study, but results reported in previous studies are used instead (<sup>a</sup>Tsuchikane *et al.* 2008, <sup>b</sup>Tsuchikane *et al.* 2018b).

& Hochkirch 2008, 高倉ら 2010) のような相互作用が存在する可能性を考察している。筆者らのこれまでの研究で、互いに近縁な交配群 I-E と G それぞれの + 型と - 型細胞を同時に混合すると、交配群 G の有性生殖が阻害される現象がみられている (Tsuchikane *et al.* 2018b)。このことから、近縁な交配群が同所に存在したとき、一方が他方の生殖を阻害し、同一の水環境における交配群の組成に影響を及ぼしている可能性が考えられる。今後、より多くの生息地で交配群組成を調査することで、近縁な交配群は本当に同じ生息地に存在しないのかを明らかにする必要がある。本研究を含め、これまでに得られているヒメミカヅキモの株は、プランクトンネットやスポイトで採集した水サンプルから手作業で単離されたものであるが、この方法では、フィールドに存在する集団を網羅的に調査することは難しい。ヒメミカヅキモを環境 DNA として検出して交配群を同定するなどの網羅的な調査法が確立されれば、ヒメミカヅキモの交配群を集団遺伝学的に解析することができるだろう。このような解析方法も用いて明らかにしたフィールドにおける交配群の分布と、生殖隔離状況、生殖干渉現象の有無を比較することで、現存のヒメミカヅキモ交配群の地理的分布の決定要因が明らかにできることが期待される。

## 謝辞

本研究は、JSPS 科研費 (26440223, 15H05237, 16H04836, 18K19365, 19K06827, 20K21451) の助成を受けたものである。

## 引用文献

- Abe, J., Hori, S., Tsuchikane, Y., Kitao, N., Kato, M. & Sekimoto, H. 2011. Stable nuclear transformation of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 52: 1676–1685. doi.org/10.1093/pcp/pcr103
- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E. *et al.* 2019. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 66: 4–119. doi.org/10.1111/jeu.12691

- Akatsuka, S., Tsuchikane, Y., Fukumoto, R., Fujii, T. & Sekimoto, H. 2006. Physiological characterization of the sex pheromone protoplast-release-inducing protein from the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Charophyta). *Phycol. Res.* 54: 116–121. doi.org/10.1111/j.1440-1835.2006.00418.x
- Gröning, J. & Hochkirch, A. 2008. Reproductive interference between animal species. *Q. Rev. Biol.* 83: 257–282. doi.org/10.1086/590510
- Ichimura, T. 1971. Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. In: Nishizawa, K. (ed.) *Proceedings of the 7th International Seaweed Symposium*. pp. 208–214. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Ichimura, T. 1973. The life cycle and its control in some species of *Closterium*, with special reference to the biological species problem. Doctoral dissertation, University of Tokyo.
- 市村輝宣 1982. ミカヅキモの種分化と生殖的隔離機構. *藻類* 30: 332–343.
- Kanda, N., Ichikawa, M., Ono, A. *et al.* 2017. CRISPR/Cas9-based knockouts reveal that CpRLP1 is a negative regulator of the sex pheromone PR-IP in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Sci. Rep.* 7: 17873. doi.org/10.1038/s41598-017-18251-8
- Kasai, E., Kawachi, M., Erata, M. & Watanabe, M. M. (eds). 2004. NIES-collection. List of strains. *Microalgae and protozoa*, 7th ed. National Institute for Environmental Studies, Tsukuba.
- Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, D. K. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings Bioinf.* 20: 1160–1166. doi.org/10.1093/bib/bbx108
- Kawai, J., Kanazawa, M., Suzuki, R., Kikuchi, N., Hayakawa, Y. & Sekimoto, H. 2022. Highly efficient transformation of the model zygmatophycean alga *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex by square-pulse electroporation. *New Phytol.* 233: 569–578. doi.org/10.1111/nph.17763
- Pringsheim, E. G. 1946. *Pure cultures of algae*. Cambridge University Press, London.
- Sekimoto, H., Inoki, Y. & Fujii, T. 1993. Detection and evaluation of an inducer of a diffusible mating pheromone of the heterothallic *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 34: 991–996. doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078535
- Sekimoto, H., Satoh, S. & Fujii, T. 1990. Biochemical and physiological properties of a protein inducing protoplast release during conjugation in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Planta* 182: 348–354. doi.org/10.1007/BF02411384

- Sekimoto, H., Sone, Y. & Fujii, T. 1994. Regulation of expression of the genes for a sex pheromone by an inducer of the sex pheromone in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Planta* 193: 137–144. doi.org/10.1007/BF00191617
- 高倉耕一・西田佐知子・西田隆義 2010. 植物における繁殖干渉とその生態・生物地理に与える影響. *分類* 10: 151–162. doi.org/10.18942/bunrui.KJ00006537116
- 土金勇樹 2017. ミカツキモの有性生殖・生殖隔離・生殖様式. *植物科学最前線* 8: 175–189. doi.org/10.24480/bsj-review.8d1.00126
- Tsuchikane, Y., Fujii, T., Ito, M. & Sekimoto, H. 2005. A sex pheromone, protoplast release-inducing protein (PR-IP) Inducer, induces sexual cell division and production of PR-IP in *Closterium*. *Plant Cell Physiol.* 46: 1472–1476. doi.org/10.1093/pcp/pci158
- Tsuchikane, Y., Hamaji, T., Ota, K. & Kato, S. 2018a. Establishment of a clonal culture of unicellular conjugating algae. *J. Vis. Exp.* e57761. doi.org/10.3791/57761
- Tsuchikane, Y., Ito, M. & Sekimoto, H. 2008. Reproductive isolation by sex pheromones in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae). *J. Phycol.* 44: 1197–1203. doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00577.x
- Tsuchikane, Y., Kobayashi, H., Kato, M., Watanabe, J., Wu, J.-T. & Sekimoto, H. 2018b. Identification of a new mating group and reproductive isolation in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *J. Plant Res.* 131: 735–746. doi.org/10.1007/s10265-018-1043-8
- Tsuchikane, Y., Sato, M. & Ootaki, T. *et al.* 2010. Sexual processes and phylogenetic relationships of a homothallic strain in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae). *J. Phycol.* 46: 278–284. doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00806.x
- Tsuchikane, Y. & Sekimoto, H. 2019. The genus *Closterium*, a new model organism to study sexual reproduction in streptophytes. *New Phytol.* 221: 99–104. doi.org/10.1111/nph.15334
- Watanabe, M. M. 1977. Biosystematics in *Closterium* of sexual unicellular green algae and *Calothrix* and *Spirulina* of asexual filamentous blue-green algae, with special reference to the analyses of natural populations. Doctoral dissertation, Hokkaido University.
- Watanabe, M. M. & Ichimura, T. 1978. Biosystematic studies of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. II. Reproductive isolation and morphological variation among several populations from the northern Kanto area in Japan. *Bot. Mag. Tokyo* 91: 1–10. doi.org/10.1007/BF02489098
- Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N. *et al.* 2014. Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: E4859–E4868. doi.org/10.1073/pnas.1323926111
- Widmer, A., Lexer, C. & Cozzolino, S. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity* 102: 31–38. doi.org/10.1038/hdy.2008.69

(2022年3月10日受付, 2022年6月6日受理)

通信担当編集委員: 仲田 崇志



## ふらすもハふらすこもノ誤ニ非ラジ

仲田 崇志

フラスコモ (*Nitella*) は明治期にフラスモと呼ばれたが, 牧野 (1910. 植物学雑誌 24: 343–344) が『ふらすもハふらすこもノ誤ナリ』としてフラスコモに“訂正”した。さらに, 具体的な言及は避けつつフラスコモと呼ばれた証拠の存在を示唆した (牧野 1916. 植物研究雑誌 1: 35)。最近, 山ノ内・加藤 (2021. 藻類 69: 71–78; 2022. 藻類 70: 135) は, 命名者が吉田雀巢庵 (1805–1859) で「フラスコ/西洋藻」の色 (当時は緑色) に基づいて命名したと, 元来フラスモと呼ばれた可能性を指摘した。しかしフラスコモではなくフラスモとされた理由は不明のままだった。

牧野 (1916) はまた「ふらすもノ名ノ意義甚ダ解スベカラズ」と述べたが, 実は江戸後期の俗語辞書『俚言集覧』 (太田全斎編。1800年頃成立) に「フラス 硝子罎 蛭詞也 ふらすこも云」とある (ことわざ研究会監修 1993. 『俚言集覧 自筆稿本版 第八巻』 p. 105)。フラスコは一部でフラスと呼ばれていたわけだ。「フラス色の藻」であればフラスモで意味が通じる。すでに定着したフラスコモの名を今更フラスモに戻すべきとは思わないが, フラスコモに改名してしまったのは牧野の勇み足だったかもしれない。

なお余談ながら, 『増補 俚言集覧』 (1899–1900年刊) は牧野も所蔵していた (高知県立牧野植物園編 1983. 『牧野文庫蔵書目録 (邦文図書の部)』)。



『増補 俚言集覧』 (村田ら 1899 [上・中], 1900 [下]. 筆者蔵). 本書の刊行以前, 『俚言集覧』は写本でのみ知られた。左, 書影。右, 「ふらす」の項目 (下巻 p. 262)。自筆稿本とは字体など僅かに異なる。