

# ミカツキモの有性生殖・生殖隔離・生殖様式

土金勇樹

日本女子大学理学部物質生物科学科

〒112-8681 東京都文京区目白台 2-8-1

Yuki Tsuchikane

## Analysis of reproductive isolation, reproductive compatibility, and sexual reproduction in *Closterium*

Key words: algae, *Closterium*, pheromone, reproductive isolation, sexual reproduction

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

DOI: 10.24480/bsj-review.8d1.00126

### 1. はじめに

筆者は有性生殖の解析を行うためにミカツキモという藻類に注目している。本総説では、ミカツキモと呼ばれる藻類の紹介を行い、有性生殖機構、生殖隔離機構、生殖様式における研究例をあげながら、なぜミカツキモを用いて研究を行うのか解説したい。また、本稿は基本的に過去の総説（土金・関本 2012, 土金 2013, Sekimoto Abe and Tsuchikane 2012）の内容に基づいて加筆・再構成を行った。

### 2. 陸上植物とミカツキモの関係

ミカツキモ属 (*Closterium*) はシャジクモ藻綱に属した藻類である。このシャジクモ藻綱は陸上植物にもっとも近縁な藻類であることが知られている

(McCourt et al. 2004)。中でも、ホシミドロ目、コレオケーテ目、シャジクモ目のいずれが陸上植物と近縁であるかについて、様々な解析がなされており、近年では、ミカツキモ属を含むホシミドロ目が陸上植物に最も近縁であることが示唆されている（図 1, Wickett et al. 2014, Delwiche and cooper 2015）。つまりミカツキモは陸上植物にもっとも近縁な藻類の仲間であり、植物の進化を考える上で重要な位置に存在する。

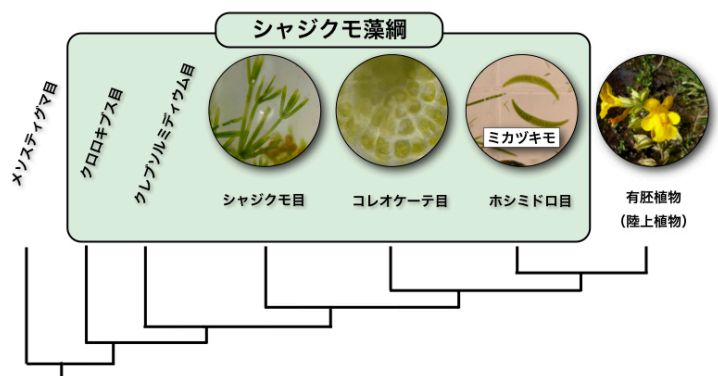


図 1 ストレプトファイツ類の簡易系統関係

Wickett et al. 2014 を参考にした。陸上植物とシャジクモ藻綱などを合わせた単系統群をストレプトファイツ類と呼ぶ。ホシミドロ目、コレオケーテ目、シャジクモ目のいずれが陸上植物と最も近縁であるかについて議論されており、近年ではこの図の関係が支持されている。

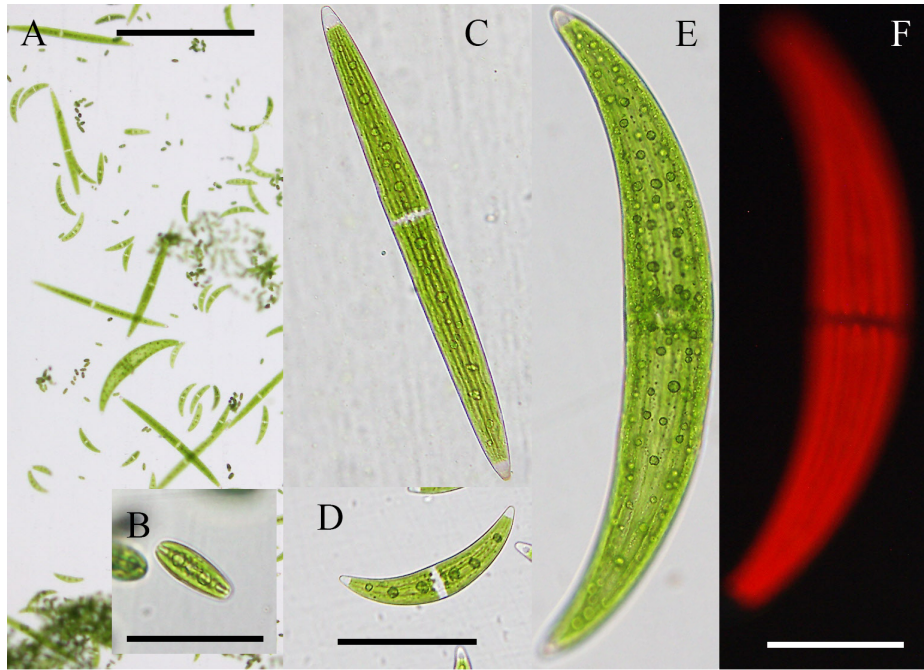


図2 様々なミカツキモ

A) 以下4種のミカツキモを混合したもの。形態的に実に多様であることがわかる。B) ヒメウリミカツキモ (*C. navicula*; NIES-175) .C) ナガミカツキモ (*C. acerosum*; NIES-127) .D) ジュズミカツキモ (*C. moniliferum*; NIES-3646) .E) オオミカツキモ, 単にミカツキモと呼ばれる場合もある (*C. ehrenbergii*; NIES-228) .F) オオミカツキモの葉緑体。蛍光顕微鏡を用いて葉緑体の自家蛍光を撮影したもので、葉緑体の形態を詳細に観察することができる。スケールバー = 500  $\mu\text{m}$  (A) , 50  $\mu\text{m}$  (B) , 100  $\mu\text{m}$  (C, D, E, F) .以上の株は国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲された。

### 3.ミカツキモについて

#### 3-1. 生息域と分類

ホシミドロ目には、単細胞のものと一列細胞無分枝の糸状体のものがある。ミカツキモ属の仲間は世界中の湖沼や水田などの淡水性止水域に生育する単細胞生物であり、細胞の形や大きさ、細胞先端の特徴などによって分類される。その形態は多様であり、どのように進化してきたのか、興味を持たれる(図2 A, B, C, D, E)。細胞壁に包まれた1つの細胞は、2つの葉緑体と、それに挟まれる形で核を持つ。葉緑体にはピレノイドが観察され、これも形態学的分類の指標の一つとなる。また、葉緑体は浅裂しているため、複数の溝が観察される(図2 F)。

ミカツキモ研究は Ralfs (1848) により 36 種が発表されたことに始まる。以来分類学的な研究がなされており、その研究史は伊藤 (1965) により詳細にまとめられている。中でも注目すべき仕事は、W. West and G. S. West 「A Monograph of the British Desmidiaceae」(第一巻が 1904 年に発表され、1923 年両 West 死去後に、Nellie Carter が第 5 巻を出して完結している) であり、基本種 60 種、変種 37 種、品種 6 種が記載されている。

現在、研究に最も用いられている種類は *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex と呼ばれている (図3)。Ichimura and Watanabe (1976) により、3種 (*C. peracerosum*, *C. strigosum*, *C. littorale*) の種複合体とされた。このように長い名称を持つため、筆者は本生物集団を通称としてヒメミカヅキモと呼んでいる。今後、一形態種のミカヅキモに3つの異なる学名が付けられたシノニムであるのか、やはり3種は別の種なのか、分類学的な再検討が必要である。

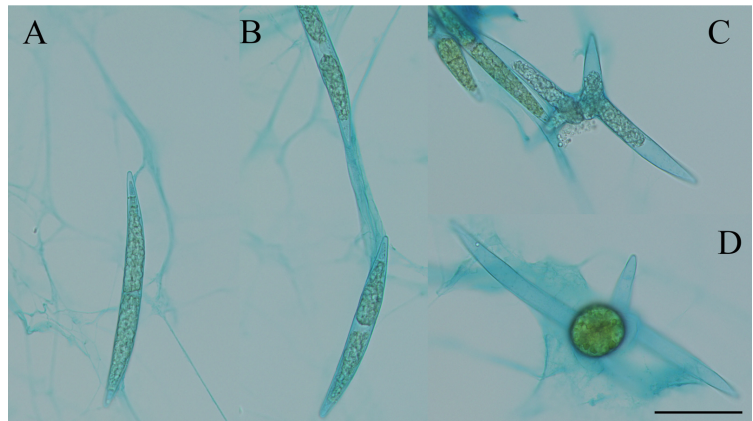


図3 ヘテロトリズム系統の接合過程

アルシアンブルー染色を施し、多糖性の粘液を青色に可視化した。A) 栄養細胞。B) 有性分裂。2つの配偶子嚢細胞が形成される。C) プロトプラスト (配偶子) 放出。D) 接合子。スケールバー = 50  $\mu\text{m}$ 。

## 4. 接合と呼ばれる有性生殖

ミカヅキモには遺伝的に決定された性を持つものが存在し、それらはヘテロトリズムと呼ばれる。この相補的な性は雌雄にあたるものの、形態的な違いが観察されないために+型、-型と呼ばれている。通常はそれぞれが細胞分裂による無性生殖を行い増殖するが、窒素源の欠如などのストレス条件下で+型細胞と-型細胞の間で接合と呼ばれる有性生殖が行われる (図4A)。

### 4-1. 粘液放出

ヘテロトリズム系統の接合では、まず+型、-型の細胞から多糖性の粘液の分泌が促進される (図3A) (Akatsuka et al. 2003)。図3はアルシアンブルー染色を施し、粘液を青色に可視化したものである。ミカヅキモは生活環を通して鞭毛のような運動器官を持たないため、この粘液が細胞の移動にかかわるものと考えられている (Domozych et al. 1993)。

### 4-2. 有性分裂

次に両接合型細胞が細胞分裂を行う (図3B)。この有性生殖時に同調的に起こる細胞分裂は有性分裂と呼ばれ (Ichimura 1971)、DNA合成中の細胞の融合を避けるために、細胞周期を同調させる働きがあると考えられている (Tsuchikane et al. 2003)。また、この有性分裂を行った後の細胞は分裂面の半細胞が伸長せず、左右非対称な形態を示しており、配偶子嚢細胞 (gametangial cell) と呼ばれている (Ichimura 1971)。

### 4-3. ペア形成とプロトプラスト (配偶子) 放出

次に+型と-型の配偶子嚢細胞がペアとなり接合突起を形成する (図3C)。この接合突起に向けて両細胞の細胞質が凝縮し、最終的に放出される。ミカヅキモでは、この細胞質 (プロトプラスト, protoplast) は配偶子 (gamete) と呼ばれ、それらが融合して接合子を形成する (図3D)。この接合子は乾燥などのストレスに耐性があり、環境が回復すると接合

子から発芽嚢が放出される。この状態で減数分裂が起こり次世代の+型と-型の細胞がそれぞれ一個体ずつ形成される。このような接合過程は単一接合胞子型 (single zygospor type) と呼ばれ、ヒメミカツキモ (図3) やナガミカツキモ (図2C) で観察される。一方、ジュズミカツキモ (図2D) やオオミカツキモ (図2E) などはペア形成と有性分裂の順番が異なる、双子接合胞子型 (twin zygospor type) の接合を行う事が知られている (Ichimura 1978, 土金 2015)。

## 5. ヘテロタリズム系統の性フェロモン

### 5-1. 有性生殖の誘起と性フェロモン

ミカツキモの+型, -型細胞は, 窒素源を含む栄養培地 (C 培地) を用いて別々に培養され, 系統株として維持されている。また, 両者を窒素源を含まない接合誘導培地 (MI 培地) 中で混合することで接合を誘起することが可能であり (Ichimura 1971), どちらか1つの接合型細胞を接合誘導培地で培養しても接合は誘起されない。このように, ミカツキモの培養方法は市村 (1979a, b) により確立された。この合成培地を用いた培養法と有性生殖の安定した誘導方法の存在が, ミカツキモを実験材料として使う利点の1つである。実際に, この培養系を用いる事で, 有性生殖における解析が可能となり, 多くの研究が行われてきた (Hamada et al. 1982, Ichimura 1983, Ichimura and Kasai 1987, 1995, Kasai and Ichimura 1987, 1990, Kato et al. 1981, 1983, Watanabe and Ichimura 1982)。そして, 多くの研究者が注目したのが, 性認識機構である。ヒメミカツキモの両接合型細胞を, 寒天培地を用いて直接の接触を妨げた状態で共存させた場合, 片方の接合型細胞から細胞質の放出が行われることが示唆され (Kato et al. 1981), ヒメミカツキモにおける細胞間の相互認識には培地中を拡散する物質, すなわち性フェロモンが関わっていることが示唆された。拡散性の性フェロモンが存在するならば, ヒメミカツキモの接合を誘起することで, 培地中に放出されているはずである。

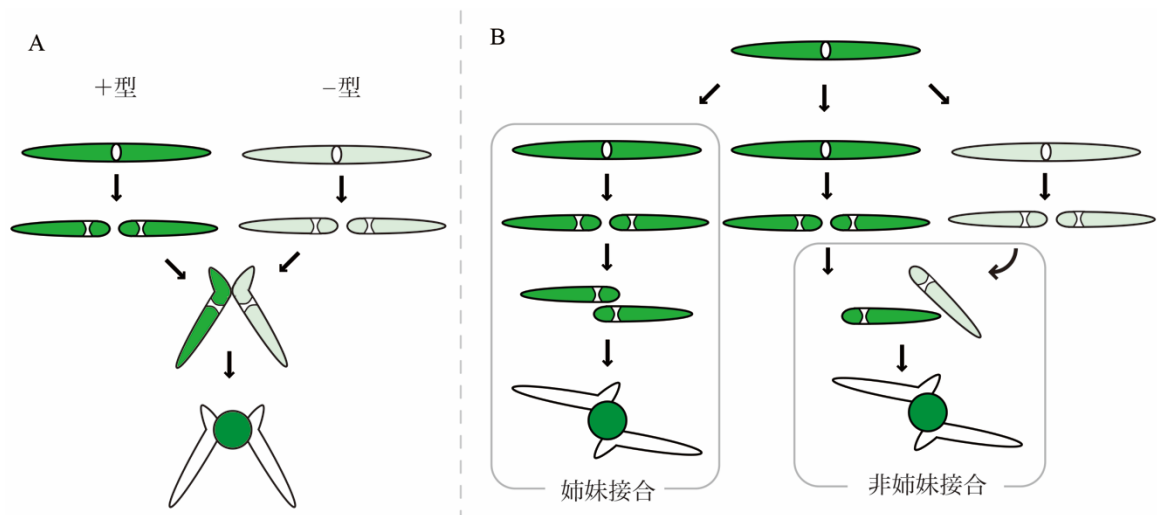


図4 ヒメミカツキモの接合過程

A: ヘテロタリズム系統の接合過程。B: ホモタリズム系統における姉妹接合と非姉妹接合。姉妹接合は1細胞由来の姉妹配偶子嚢細胞同士が接合する。非姉妹接合は別個体由来の配偶子嚢細胞同士が接合する。土金 2013 より改変後転載。

## 5-2. 性フェロモン, PR-IP Inducer と PR-IP

Sekimoto ら (1990) は、ヒメミカヅキモの接合を誘起した後、細胞を除去することで性フェロモンが含まれているであろう培地を回収した。このような調製培地を-型細胞に添加すると、細胞は相手が存在するかのように細胞質を放出した。一方、+型細胞に添加しても細胞質の放出は観察されなかった。そして、この調製培地から-型細胞の細胞質を放出させる活性を指標にして、活性タンパク質が精製された。PR-IP (プロトプラスト放出誘導タンパク質; Protoplast-Release-Inducing Protein) である。この物質は 19 k と 42 k のサブユニットから構成される糖タンパク質であり、+型細胞から放出され、-型細胞に特異的に作用する (Sekimoto et al. 1990)。また、19 k サブユニットが-型細胞の表面に存在するであろう受容体と相互作用することがビオチン化 PR-IP を用いた実験から示されている (Sekimoto et al. 1993)。この PR-IP は細胞混合時に効率良く放出されることから、-型細胞の影響を受けていることが考えられた。そして、-型細胞のみを培養した調製培地から、PR-IP の放出を促進する性フェロモンである PR-IP Inducer が単離された (Nojiri et al. 1995)。この性フェロモンは 18.7 k の糖タンパク質であり、+型細胞のみに作用する。このように、ヒメミカヅキモにおいては性の特徴付け、有性生殖を制御する性フェロモンが単離同定され、有性生殖時の情報交換機構の解析が進められてきた。

## 5-3. 有性分裂誘導フェロモンと多糖性粘液放出誘導フェロモン

有性生殖の初期に起こる分裂は、単独の培養ではほとんど観察されず、+型細胞と-型細胞を混合する事で促進されることから、有性分裂と呼ばれ、両接合型の相互作用により誘導されることが示唆されていた (Ichimura 1971)。Tsuchikane ら (2003) は、この現象が性フェロモンにより制御されているのかを、調製培地を作成することにより検証した。有性分裂は通常の細胞分裂と形態的に区別することができない。そのため、接合誘導培地、または前もって両接合型細胞を混合培養し、細胞を除去した調製培地で培養した場合の細胞分裂を比較した。接合誘導培地で培養した細胞では、10%程度の細胞が分裂を行ったが、調製培地を用いて培養した細胞では 60%程度の細胞が分裂したため、増加した約 50%の分裂を有性分裂と考えた。このようにして、+型細胞から放出され、-型細胞の有性分裂を誘導する活性 (SCD-IP-minus, sexual cell division inducing pheromone - minus) と、-型細胞から放出され、+型細胞の有性分裂を誘導する活性 (SCD-IP-plus) の 2 種類が、+型と-型細胞を混合した調製培地から検出された (Tsuchikane et al. 2003)。また、有性生殖の初期から多糖性粘液の放出が促進されるが、これもそれぞれの接合型細胞が特異的に放出する性フェロモン (MS-SP, mucilage secretion-stimulating pheromone) によることが明らかになっている (Akatsuka et al. 2003)。

## 5-4. 性フェロモンは複数の活性を持つ

これら有性分裂誘導フェロモンと、粘液放出誘導フェロモンの生理学的、生化学的特徴が、既に単離同定されていた性フェロモンと類似していたことから、性フェロモンの多機能性についての解析が行われた。PR-IP Inducer を酵母発現系により産生させ、その活性を調べ

たところ、PR-IP 放出誘導活性のみならず、有性分裂誘導活性をも保持していた (Tsuchikane et al. 2005)。また、精製した PR-IP では、プロトプラスト (配偶子) 放出誘導活性のみならず低濃度の添加で有性分裂誘導活性が観察され、さらに低濃度の添加で多糖性粘液放出誘導活性が観察された (Akatsuka et al 2006)。すなわち、ヒメミカツキモの接合では、-型細胞から放出される PR-IP Inducer と、それを受容した+型細胞が放出する PR-IP の二つの性フェロモンが、複数の活性を持つことで、有性生殖の各段階を制御するのである。

### 5-5. 別種のみカツキモの性フェロモン

一方、双子接合胞子型のオオミカツキモにおいても性フェロモンの解析が行われており、そのアミノ酸配列はヒメミカツキモの PR-IP Inducer と類似していることから、性フェロモンによる有性生殖の制御はみカツキモ属に広く共通する機構であると考えられる (Fukumoto et al 2003)。このようにみカツキモでは有性生殖時における情報交換機構の解析が行われてきた。そして、これらの知見は、次に示すような種生物学的研究のブレイクスルーへとつながった。

## 6. みカツキモにおける生物学的種

### 6-1. 交配群

種分化の研究において、種の客観的認識と同定は必須である。みカツキモは形態形質が少ないこともあり、形態学的種概念の他に、生物学的種概念が導入され解析されてきた (Ichimura 1983, Coesel and Menken 1988, Ichimura and Kasai 1984)。Ichimura (1981) は一形態種であるオオミカツキモについて、各地から採集した株を用いて接合実験を行う事で、生殖隔離の状況を明らかにした。常に接合子が形成される株同士を1つの交配群としてまとめ、それらと安定して接合子を形成しない別の株から区別した。交配群の異なる株では多くの場合、生殖反応はおこらないものの、場合によっては接合子が形成される。しかし、そのほとんどは雑種崩壊などを起こし、安定した子孫は得られない。このように、みカツキモの形態種には、さらに生殖的に隔離した生物学的種 (交配群) が含まれていることが明らかになっている。

### 6-2. シンゲン

原生生物であるゾウリムシ (*Paramecium aurelia* など) では、生物学的種の単位としてシンゲン (syngen) が用いられている (Sonneborn 1957)。同一のシンゲンに属する集団間では遺伝子交流が可能であるが、異なるシンゲンの間では遺伝子の交流が起こらない。みカツキモでは Ichimura (1981) により生物学的種に対して、シンゲンではなく、交配群という言葉が使用された。これは、交配群内における接合子が正常に発芽し、正常な子孫が得られるか不明であったためである。現在では、交配群も1つの生物学的種であり、シンゲンと同じ概念として扱われる。

### 6-3. ヒメミカツキモの交配群

Denbohら(2003)によりオオミカツキモにおける15の交配群の系統関係が明らかにされたが、生殖隔離の原因について、生理学的、分子生物学的な解析は行われておらず、種の認識機構の詳細は不明であった。生理学的解析が進んでいるヒメミカツキモにおいても、生殖的に隔離された6つの交配群, II-A, II-B, II-C, I-D, I-E, I-Fの存在が報告されていた(Ichimura 1973, Watanabe 1977, Watanabe and Ichimura 1978)。国立環境研究所微生物系統保存施設では、交配群 I-D を IA, I-E を IB と表記している。また、交配群 I-F とされた系統 (M-10-21) は現存しない。これまで性フェロモンの解析に主に用いられてきたのは交配群 I-E であり、これは他の交配群の細胞と接合を試みても有性生殖が観察されず、完全に生殖隔離している(図5B) (Watanabe 1977, Sekimoto et al. 1995, Tsuchikane et al. 2008)。また、生殖的な隔離が不完全に行われている交配群 (II-A, II-B) の間では有性生殖が観察され、若干の接合子が形成される(図5B) (Tsuchikane et al. 2008)。これら交配群 II-A と交配群 II-B は系統的に近い関係にあり、完全な隔離の観察される交配群 I-E との関係は遠く、生殖隔離の状況と分子系統関係に相関がみられる(図5A) (Tsuchikane et al. 2008)。筆者はこれらヒメミカツキモの交配群を用い、種生物学的解析に有性生殖機構の知見を融合することで、次に示すような種分化研究を行ってきた。



図5 交配群間の系統関係と生殖隔離の状況

A) ホモタリズム系統とヘテロタリズム系統の系統関係。Tsuchikane et al. 2012 を参考に作成した。B) 生殖隔離の状況。Z, 接合子が観察される。z\*, 若干のハイブリッド接合子が観察される。Z\*\*, 姉妹接合子が観察される。-, 接合反応は観察されない。n.a., 未試験。土金 2013 より改変後転載。

### 6-4. 性フェロモンによる生殖隔離

生物学的種概念に基づく種とは、生殖的に他の集団から隔離されている集団のことであり、種分化は、生殖隔離が進むことにより起こる。つまり、生殖隔離機構を解析することで、種分化機構が理解できる。筆者らは種分化機構を解析する上で、ヒメミカツキモは極めて適した生物であると考えた。なぜなら、ヒメミカツキモは雌雄のコミュニケーションを司る物質が単離同定されている数少ない生物の1つだからである。そして、交配群内では、2

つの性フェロモンが相互に作用し合いながら有性生殖が進行するが、交配群間での性フェロモンの認識が損なわれることで生殖隔離が起こるものと推定した。

解析を進めたところ、交配群 I-E の性フェロモン PR-IP は交配群 II-B に作用させても反応はなく (Sekimoto et al. 1995, Tsuchikane et al. 2008) , PR-IP Inducer も作用し合わない

(Tsuchikane et al. 2008)。実際、それぞれの交配群における PR-IP Inducer 遺伝子の単離を行い、配列を比較したところ、PR-IP Inducer が作用し合う交配群 II-A と交配群 II-B の間で高い相同性が得られたものの、それらと比較して交配群 I-E の相同性は低いものであった

(Tsuchikane et al. 2008)。また、交配群 II-A の PR-IP が交配群 II-B に作用し難いことで非対称な生殖隔離が起きていることも示唆されている (未発表)。このように、交配群間の性フェロモンの認識が損なわれることが生殖隔離の原因の 1 つであり、同種と異種の個体識別は性フェロモンより行われることが示唆された。

以上のように、従来の種生物学的解析に遺伝子レベルでの解析が加わることで、交配前隔離の原因分子が特定された。今後もミカヅキモを用いた更なる解析により、種分化の実体に迫ることが可能であろう。加えて、そのためには性フェロモンの受容体の情報が不可欠である。ミカヅキモにおける有性生殖機構の解析が進めば、種生物学的解析にも大きな展開が訪れることが期待される。

## 7. ミカヅキモの生殖様式

### 7-1. ホモタリズム

ヒメミカヅキモの接合様式にはこれまで紹介してきたヘテロタリズム (図 4 A) の他に、自家和合でクローン細胞同士での接合が可能なホモタリズムが知られている。これまでにホシミドロ目におけるホモタリズムの解析例は少なく、ヘテロタリズム系統との系統関係、性フェロモンの存在やその機能に関して多くの点が謎であった。

ヒメミカヅキモにおける生殖の実体

を明らかにするうえでも、我々はホモタリズム系統 (kodama20; NIES-2666) をフィールドから新たに採集し、接合過程の解析を行った (Tsuchikane et al. 2010b)。

クローン細胞同士で接合するホモタリズムであるが、実は、1つの細胞が、細胞分裂した後、一細胞由来の姉妹配偶子囊細胞同士が進んで接合することが明らかとなった (図 6)

(Tsuchikane et al. 2010b)。この自殖のような接合を姉妹接合と呼んでいる。また姉妹接合する際に別の配偶子囊細胞が割り込み、そちらと接合する場合は 10%程度あり、これを非姉妹接合として区別している (図 4 B)。

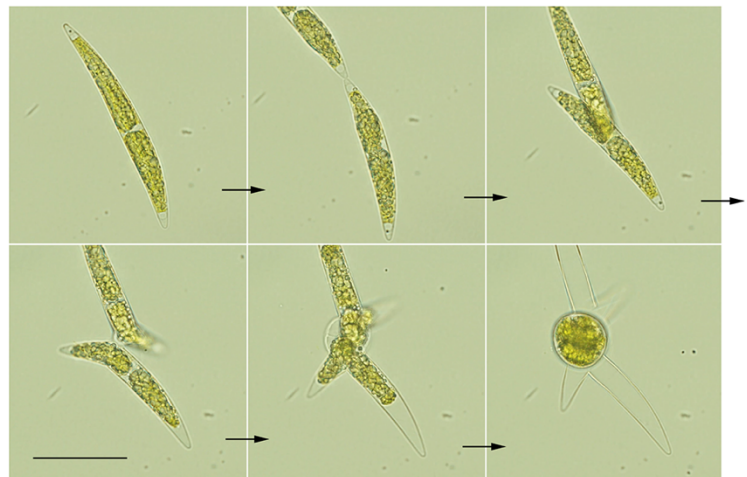


図 6 ホモタリズム系統の姉妹接合

元は 1 つだった姉妹細胞同士が進んで接合する。スケールバー= 50  $\mu$ m。土金 2013 より改変後転載。



## 7-2. ホモタリズム系統の性フェロモン

ホモタリズム系統では、細胞密度が高すぎても低すぎても接合せず、接合に最適な細胞密度が存在することが示された。このことから、細胞が自身の細胞密度を何らかの因子によって認識しているものと示唆され、細菌におけるクオラムセンシングと類似した機構が藻類に存在することが明らかとなった (Tsuchikane et al. 2010a)。Tsuchikane ら (2010a) は、この情報交換因子の同定を試みることで、ヘテロタリズム系統において性特異的に発現し、性認識に関わる性フェロモン PR-IP Inducer は、ホモタリズム系統においても細胞間相互作用に関わり接合を制御することが明らかとなった。また、ホモタリズム系統とヘテロタリズム系統の PR-IP Inducer の配列は極めて類似しており、生殖様式が異なっても作用しうるのかどうか、両者の生物学的関係が注目された。

## 7-3. ホモタリズム系統とヘテロタリズム系統の関係

ヒメミカヅキモにおけるホモタリズム系統とヘテロタリズム系統の関係について 18S rDNA のイントロン領域を用いた系統解析を行うことで、ヘテロタリズム系統である交配群 II-B と解析に使用していたホモタリズム系統 (NIES-2666) が極めて近縁である事が明らかになった (図 5 A) (Tsuchikane et al 2010b, 2012)。このことから、両者を構成する遺伝子群に大きな差は存在しないものと考えられた。

## 7-4. ハイブリッド接合子の形成

ホモタリズム系統は主に姉妹接合を行うが、元は 1 つである細胞が、分裂後どのように特定の相手を認識するのだろうか。先行研究から、1) ホモタリズム系統は接合する直前に必ず細胞分裂を行うこと、2) ヘテロタリズム系統において性特異的に発現する PR-IP Inducer がホモタリズム系統の接合にも関与していること、3) 非常に近縁なホモタリズム系統とヘテロタリズム系統ではゲノム上の大きな差はなく、生殖様式は比較的少ない遺伝子変異により推移しうる可能性が示唆されている。筆者は、ホモタリズム系統では、細胞分裂を介してヘテロタリズムの+型、-型のような状態に分化することで、速やかに姉妹接合するものと考えた。この仮説が正しいなら、近縁なホモタリズム系統とヘテロタリズム系統を混合すれば、何らかの接合反応が観察されると考えた。しかし、ホモタリズムとヘテロタリズムの接合は過去に成功の報告はなく (Lippert 1967)、いくつかの問題を解決しなくてはならなかった。過去の実験では使用した株同士が近縁でなかったために、ハイブリッド接合子が形成されなかったものと考え、生物学的に近縁な系統を実験に用いることにした。前述の通り、ヘテロタリズム系統における交配群 II-A と交配群 II-B は部分的に接合する (Watanabe and Ichimura 1978)。分子系統学的にも近縁な両者であるが、今回の実験ではこの交配群 II-B に加えて、交配群 II-A よりも交配群 II-B に近縁であり、接合の可能性が考えられるホモタリズム系統 (NIES-2666) を実験材料に選択した (図 5 A)。しかし、近縁な株を用いることで更なる問題が生じた。両者は形態的にも類似しており、混合すると区別がつかないのである。そのため生体染色の検討を行った。そして接合子形成に影響の表れなかったカルコフロールホワイトによる細胞壁染色を選択することにした。

この手法を用いて染色した+型細胞と未染色のホモタリズム系統を用いて接合実験を試みたところ、染色された接合子の観察に成功した。+型細胞単独では接合反応を示さないため、これは+型細胞とホモタリズム系統のハイブリッド接合子であると考えられた

(Tsuchikane et al. 2012)。一方、-型細胞とホモタリズム系統との混合では、まれにハイブリッド接合子が観察されたものの再現性が低く、再解析が必要であった。しかし現在では、別の系統のホモタリズム系統を使うことで少ないながらもどちらの接合型のヘテロタリズム系統とも安定してハイブリッド接合子が形成されることを確認している（未発表）。

以上のように、ホモタリズム系統とヘテロタリズム系統の間で接合子が形成されることが明らかになった。これにより、両者の接合機構、例えば性フェロモンによる情報交換機構は共通していることが示唆された。さらに、ホモタリズム系統にはヘテロタリズム系統のような「性」が生じていることが示唆される。これは「ホモタリズム系統において、一細胞由来の細胞が、ヘテロタリズム系統における+型、-型のような状態に分化することで有性生殖を行う」という仮説を支持する。今後も、細胞分裂による性分化の解析、さらには生殖様式の決定機構の解析が期待される。

## 7-5. 生殖様式の進化

ミカヅキモと同じくホシミドロ目に属するタテブエという藻類におけるホモタリズム系統の解析も行われ、同様の姉妹接合が観察された (Tsuchikane et al. 2011)。これにより、姉妹接合はミカヅキモに特異的な現象ではなく、ホシミドロ目に一般的な様式であることが考えられた。それぞれの系統にヘテロタリズムと姉妹接合を行うホモタリズムが存在することが明らかになっているが、これは、それぞれの系統で、独立にホモタリズム化、あるいはヘテロタリズム化が起きた事を示唆する。しかし、ホモからヘテロが現れたのか、ヘテロからホモが現れたのか、依然として不明である。

もしもホモタリズムの中からヘテロタリズムが突然変異として出現したのなら、この姉妹接合が性の原型であると考えられる。あるいは、ヘテロタリズムからホモタリズムが進化したのであれば、遺伝子の多様性という意味でみれば不利である自殖を行うこの姉妹接合が、別々の系統で独立に進化したことになる。この意義は非常に興味深い。この生殖様式の進化はそれぞれの分類群における系統解析により、明らかになっていくと思われる。

また、オオミカヅキモには、単為胞子を形成する株が存在する。別個体と接合することなく単為胞子を形成するため、実質的には無性生殖で、遺伝的多様性は極めて低いことが考えられる。この生殖様式においては、変動の激しい環境への適応進化の可能性も議論されている (Hendrayanti et al. 2004, Tsuchikane et al. 2014)。筆者はフィールドに出てミカヅキモ採集を行っているが、水田から採れるヒメミカヅキモのほとんどがホモタリズムである。水田のように毎年水が枯れる変動の激しい環境では、有性生殖に相手が必要なヘテロタリズム系統よりも、ホモタリズム系統の様に自ら耐乾燥性の接合子を形成する自殖のほうが有利なのかもしれない (土金 2016)。今後、さらなる採集を積み重ねることで、それぞれの接合様式が好んで生息する環境の解明が期待される。

## 8. 分子生物学的基盤

ホシミドロ目の藻類は、前述した系統関係から、植物の進化を解析する上で注目されている。ホシミドロ目では、タテブエ (*Penium margaritaceum*) においてアグロバクテリウムを用いた遺伝子導入法が確立されている (Sørensen et al. 2013)。一方、ヒメミカヅキモでは、パーティクルガン法を用いることで安定した遺伝子導入が可能であり (Abe et al. 2011)、遺伝子の抑制法も確立されている (Hirano et al. 2015, Abe et al. 2016)。更に、RNA-seq、概要ゲノム解析も行われている (未発表)。近年では、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集が緑藻や珪藻で確立され始めている (Nymark et al. 2016, Wang et al. 2016)。ヒメミカヅキモでも、シャジクモ藻綱において初めて CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子破壊株が作出された (Kanda et al. 論文投稿中)。以上のようにヒメミカヅキモは、陸上植物に近縁な藻類であるシャジクモ藻綱において、最も分子生物学的な基盤が整った生物である。

## 9. おわりに

シャジクモ藻綱に含まれる藻類は、植物の分子進化を考える上で重要な分類群であるにもかかわらず、この分類群に注目した研究例は未だ少なく、今後の解析が期待される。そして、ミカヅキモは有性生殖時の情報交換機構の解析が行われており、分子生物学的な基盤も整っている。そのため、性の進化を解析するうえでも中心となる重要な生物であると考えている。

別系統の藻類であるボルボックス目では性分化に関するゲノムレベルでの解析が進んでいるが、シャジクモ藻綱の藻類では多くが不明のままである。ボルボックス目の雌雄認識機構や性決定機構はミカヅキモと共通しているのか？それとも性は独立に進化しているのか？どのように進化したのか？今後ミカヅキモを用いた解析により、これらの疑問が解消されるものと期待される。この様にミカヅキモは陸上植物と藻類のミッシングリンクを埋める研究材料と言えるだろう。

## 10. 謝辞

本総説は、日本植物学会第 80 回大会(2016 年 9 月)に開催されたシンポジウム「Sex in water and on land ～ゲノム解析から見てきた性の多様性と共通性～ オーガナイザー；土金勇樹 (日本女子大学)、新垣陽子 (東京大学)、西山智明 (金沢大学)」に関連するものです。有性生殖は、生物が多様性を獲得する原動力であると考えられ、生物界に広く共通した重要な現象です。その解明は立ち遅れていた部分がありましたが、ゲノム解析の発展と共に大きく前進しています。このシンポジウムでは、藻類 (ボルボックス、ミカヅキモ、シャジクモ) と陸上植物 (ゼニゴケ、カニクサ、カキ、キウイ) を用いた性決定や性分化機構における最新の解析例を紹介し、比較することで有性生殖の多様性と共通性、そして進化について議論しました。ご講演いただいた、新垣陽子さん (東京大学)、山本荷葉子さん (東京大学)、関本弘之先生 (日本女子大学)、西山智明先生 (金沢大学)、肥後あすか博士 (京都大学)、上口 (田中) 美弥子先生 (名古屋大学)、赤木剛土先生 (京都大学) (発表順) に感謝申し上げます。

本稿で紹介した著者らの研究は、研究活動に関わるすべての皆様のご協力により遂行されました。研究の推進にあたり、藤伊正教授（元 東洋大学）、関本弘之教授（日本女子大学）、伊藤元己教授（東京大学）、野崎久義准教授（東京大学）、阿部淳博士（中央大学）、加藤将博士（日本国際湿地保全連合）より有益なご助言を頂きました。図2の写真は立川真侑子、平田優香、福島早貴が共同で撮影しました。日本女子大学において大滝知子、加藤万智、神田奈保、国分夢、小林弘佳、佐藤真知子、土屋美紀、中井彩香、横山佳菜氏を始め共に研究を行った皆様。この紙面を借りてこれらすべての皆様に心から感謝の意を表します。

## 11. 引用文献

- Abe, J., Hirano, N., Komiya, A., Kanda, N., Fujiwara, A., Hori, S., Tsuchikane, Y. & Sekimoto, H. 2016. Preparation of knockdown transformants of unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Bio-protocol* 6: e1813.
- 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.
- 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.
- Akatsuka, S., Sekimoto, H., Iwai, H., Fukumoto, R.H. & Fujii, T. 2003. Mucilage secretion regulated by sex pheromones in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 44: 1081-1087.
- Coesel, P. & Menken, S. 1988. Biosystematic studies on the *Closterium moniliferum/ehrenbergii* complex (chlorophyta, conjugatophyceae) in western europe. I. Isozyme patterns. *Eur. J. Phycol.* 23: 193-198.
- Delwiche, C.F. & Cooper, E.D. 2015. The evolutionary origin of a terrestrial flora. *Curr. Biol.* 25: R899-910.
- Denboh, T., Ichimura, T., Hendrayanti, D. & Coleman, A.W. 2003. *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (charophyceae, chlorophyta) species complex viewed from the 1506 group i intron and its2 of nuclear rDNA. *J. Phycol.* 39: 960-977.
- Domozych, C.R., Plante, K. & Blais, P. 1993. Mucilage processing and secretion in the green alga *Closterium*. 1. Cytology and biochemistry. *J. Phycol.* 29: 650-659.
- Fukumoto, R., Fujii, T. & Sekimoto, H. 2003. Cloning and characterization of a cDNA encoding a sexual cell division-inducing pheromone from a unicellular green alga *Closterium ehrenbergii* (chlorophyta). *J. Phycol.* 39: 931-936.
- Hamada, J., Yoshizawa-Katoh, T. & Tsunewaki, K. 1982. Genetic study on mating type genes by a new type of tetrad analysis in *Closterium ehrenbergii*. *Bot. Mag. Tokyo* 95: 101-108.
- Hendrayanti, D., Denboh, T., Ichimura, T. & Motomura, T. 2004. Molecular evidence of parallel origins of two different parthenosporic lineages directly from heterothallic lineages in the *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (charophyceae, chlorophyta) species complex. *Phycologia* 43: 727-736.

- Hirano, N., Marukawa, Y., Abe, J., Hashiba, S., Ichikawa, M., Tanabe, Y., Ito, M., Nishii, I., Tsuchikane, Y. & Sekimoto, H. 2015. A receptor-like kinase, related to cell wall sensor of higher plants, is required for sexual reproduction in the unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 56: 1456-1462.
- 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, 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. University of Tokyo.
- Ichimura, T. 1981. Mating types and reproductive isolation in *Closterium-ehrenbergii* meneghini. *Bot. Mag. Tokyo* 94: 325-334.
- Ichimura, T. 1983. Hybrid inviability and predominant survival of mating type minus progeny in laboratory crosses between two closely related mating groups of *Closterium-ehrenbergii*. *Evolution* 37: 252-260.
- 市村輝宜 1979a 有性生殖の誘起と交配実験法. 西澤一俊, 千原光雄 (編) 藻類研究法. pp. 195-209. 共立出版. 東京.
- 市村輝宜 1979b 代表的な淡水産微細藻類の培養例. 西澤一俊, 千原光雄 (編) 藻類研究法, pp. 209-223. 共立出版. 東京.
- Ichimura, T. & Kasa, F. 1984. Post-zygotic isolation between allopatric mating groups of *Closterium ehrenbergii* meneghini (conjugatophyceae). *Phycologia* 23: 77-85.
- Ichimura, T. & Kasai, F. 1987. Time-lapse analyses of sexual isolation between two closely related mating groups of the *Closterium ehrenbergii* species complex (chlorophyta). *J. Phycol.* 23: 523-534.
- Ichimura, T. & Kasai, F. 1995. Dissection of conjugants and mating type plus and minus cells in selfing clones of the isogamous green alga *Closterium ehrenbergii*. *Sex. Plant. Reprod.* 8: 44-48.
- Ichimura, T. & Watanabe, M.M. 1976. Biosystematic studies of *Closterium-peracerosum-strigosum-littorale* complex 1. Morphological variation among inbreeding populations and an experimental demonstration for source of cell-size variation. *Bot. Mag. Tokyo* 89: 123-140.
- 伊藤市郎 1965. 興味深い淡水藻チリモ類. 採集と飼育 27: 124-133.
- Kasai, F. & Ichimura, T. 1987. Stable diploids from intragroup zygospores of *Closterium-ehrenbergii* menegh (conjugatophyceae). *J. Phycol.* 23: 344-351.
- Kasai, F. & Ichimura, T. 1990. A sex determining mechanism in the *Closterium ehrenbergii* (chlorophyta) species complex. *J. Phycol.* 26: 195-201.
- Kato, A., Obokata, J. & Sasaki, K. 1981. Mating type interaction in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale*: Mating induced protoplast release. *Plant Cell Physiol.* 22: 1215-1222.
- Kato, A., Takagi, T. & Sasaki, K. 1983. Light conditions for sexual reproduction in heterothallic strains of *Closterium*. *Plant Cell Physiol.* 24: 93-100.
- Lippert, B.E. 1967. Sexual reproduction in *Closterium moniliferum* and *Closterium ehrenbergii*. *J. Phycol.* 3: 182-198.
- McCourt, R.M., Delwiche, C.F. & Karol, K.G. 2004. Charophyte algae and land plant origins. *Trends Ecol. Evol.* 19: 661-666.

- Nojiri, T., Fujii, T. & Sekimoto, H. 1995. Purification and characterization of a novel sex pheromone that induces the release of another sex pheromone during sexual reproduction of the heterothallic *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 36: 79-84.
- Nymark, M., Sharma, A.K., Sparstad, T., Bones, A.M., & Winge, P. 2016. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Sci. Rep.* 6: 24951
- Ralfs, J. 1848. The british desmidiaceae. London : Reeve, Benham, and Reeve.
- Sekimoto, H., Abe, J. & Tsuchikane, Y. 2012. New insights into the regulation of sexual reproduction in *Closterium*. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 297: 309-338.
- 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.
- Sekimoto, H., Satoh, S. & Fujii, T. 1993. Analysis of binding of biotinylated protoplast-release-inducing protein that induces release of gametic protoplasts in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Planta* 189: 468-474.
- Sekimoto, H., Sone, Y. & Fujii, T. 1995. Biochemical, physiological, and molecular analysis of sexual isolation in the species complex *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* (chlorophyta). *J. Phycol.* 31: 611-615.
- Sonneborn, T.M. 1957 Breeding systems, reproductive methods, and species problems in protozoa. In Mayr, E. [ed.], The species problem, 125-324. American Association for the Advancement of Science, Washington, DC.
- Sørensen, I., Fei, Z., Andreas, A., Willats, W.G.T., Domozych, D.S. & Rose, J.K.C. 2013. Stable transformation and reverse genetic analysis of *penium margaritaceum*: A platform for studies of charophyte green algae, the immediate ancestors of land plants. *Plant J.* 77: 339-351.
- 土金勇樹 2013. 藻類における生殖様式の多様性と進化. *Bunrui* 13:77-84.
- 土金勇樹 2015. ミカヅキモ属における接合様式の多様性. *Japan J. Phycol.* 63:98-102.
- 土金勇樹 2016. ミカヅキモの性. iBooks, Apple, USA.  
<https://itunes.apple.com/jp/book/ミカヅキモの性/id1183243875?mt=11>
- 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.
- Tsuchikane, Y., Fukumoto, R., Akatsuka, S., Fujii, T. & Sekimoto, H. 2003. Sex pheromones that induce sexual cell division in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (charophyta). *J. Phycol.* 39: 303-309.
- 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.
- Tsuchikane, Y., Kokubun, Y. & Sekimoto, H. 2010a. Characterization and molecular cloning of conjugation-regulating sex pheromones in homothallic *Closterium*. *Plant Cell Physiol.* 51: 1515-1523.
- Tsuchikane, Y., Nakai, A. & Sekimoto, H. 2014. Detailed analyses on the parthenospore formation in *Closterium moniliferum* (zygnematophyceae, charophyta). *Phycologia* 53: 571-578.

- Tsuchikane, Y., Sato, M., Ootaki, T., Kokubun, Y., Nozaki, H., Ito, M. & Sekimoto, H. 2010b. Sexual processes and phylogenetic relationships of homothallic strain of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (zygnematales, charophyceae) . *J. Phycol.* 46: 274-284.
- 土金勇樹 関本弘之 2012. ミカヅキモの生殖について. *海洋と生物* 34:426-434.
- Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Hindak, F., Nozaki, H. & Sekimoto, H. 2012. Zygosporangium formation between homothallic and heterothallic strains of *Closterium*. *Sex. Plant. Reprod.* 25: 1-9.
- Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Kokubun, Y., Abe, J. & Sekimoto, H. 2011. Conjugation processes of *penium margaritaceum* (zygnemophyceae, charophyta). *Phycol. Res.* 59: 74-82.
- 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. Hokkaido University.
- Watanabe, M.M. & Ichimura, T. 1978. Biosystematic studies of *Closterium-peracerosum-strigosum-littorale* complex ii. Reproductive isolation and morphological variation among several populations from northern kanto area in japan. *Bot. Mag. Tokyo* 91: 1-10.
- Watanabe, M.M. & Ichimura, T. 1982. Biosystematic studies of the *Closterium-peracerosum-strigosum-littorale* complex iv. Hybrid breakdown between two closely related groups, group ii-a and group ii-b. *Bot. Mag. Tokyo* 95: 241-247.
- Wang, Q., Lu, Y., Xin, Y., Wei, L., Huang, S., & Xu, J. 2016. Genome editing of model oleaginous microalgae *Nannochloropsis* spp. by CRISPR/Cas9. *Plant J.* 88 (6): 1071-1081
- West, W., West, G. S., & Carter, N. A monograph of the British Desmidiaceae I-V. Ray Society, London. 1904-1923.
- Wickett, N.J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M.S., Burleigh, J.G., Gitzendanner, M.A., Ruhfel, B.R., Wafula, E., Der, J.P., Graham, S.W., Mathews, S., Melkonian, M., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Miles, N.W., Rothfels, C.J., Pokorny, L., Shaw, A.J., DeGironimo, L., Stevenson, D.W., Surek, B., Villarreal, J.C., Roure, B., Philippe, H., dePamphilis, C.W., Chen, T., Deyholos, M.K., Baucom, R.S., Kutchan, T.M., Augustin, M.M., Wang, J., Zhang, Y., Tian, Z., Yan, Z., Wu, X., Sun, X., Wong, G.K.-S. & Leebens-Mack, J. 2014. Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *PNAS.* 111: E4859-E4868.