

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06830

研究課題名（和文）競争排除則の再検証．Gauseのゾウリムシ類実験における性の影響．

研究課題名（英文）Re-examination of competitive exclusion principle: effect of sex on Paramecium experiments by Gause

研究代表者

高倉 耕一（Takakura, Koh-Ichi）

滋賀県立大学・環境科学部・教授

研究者番号：50332440

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年の研究で、性的な種間相互作用である繁殖干渉が群集構造に大きな影響を及ぼすことが明らかになっており、過去に資源競争の結果と考えられていた種の排除が、繁殖干渉の結果であることが示される例も増加している。繁殖干渉では、異種間の配偶がメスの繁殖成功度を下げ、最終的に一方の種が排除される。本研究では、資源競争の結果としての競争排除の典型と考えられていたゾウリムシ類における競争排除を、通常の有性生殖生物における性に相当する接合型に注目して、再検証することを目的とした。その結果、ゾウリムシ-ヒメゾウリムシの接合型の組み合わせによって、2種の混合培養時の個体群動態が大きく影響を受けることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同じ資源を利用する2種は共存できないとする競争排除則は、生態学における基本法則とされてきた。応用生態学においても、しばしば競争排除則が暗黙の前提とされている。しかし、競争排除とされてきた現象のいくつかについて、繁殖干渉によるものであったことが近年示された。ただし、最も古く最も著名な、ゾウリムシ類を用いた研究（Gause, 1934）については、再検証がなされていなかった。本研究により、この2種系においても、純粋な資源競争による排除が必ずしも生じないこと、近縁種との相互作用が接合型（性）に依存しうることが示された。このことは、生態学における基本法則を今一度見直す必要を強く示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have shown that reproductive interference between related species can have a significant impact on community structure, and an increasing number of cases have shown that species exclusion, thought in the past to be the result of resource competition, is now the result of reproductive interference. Reproductive interference refers to the process by which interspecific courtship reduces the reproductive success of females, ultimately resulting in the elimination of one species. In this study, we aimed to reexamine competitive exclusion in *Paramecium* spp., which has been considered typical of competitive exclusion as a result of resource competition, by focusing on mating type, which corresponds to sex in normal sexually reproducing organisms. We found that population dynamics during mixed culture of the two species were significantly affected by the combination of mating types of *Paramecium caudatum* and *Paramecium tetraurelia*.

研究分野：個体群生態学、群集生態学、繁殖干渉

キーワード：ゾウリムシ 競争排除 資源競争 繁殖干渉 個体群動態

## 1. 研究開始当初の背景

近年、理論研究および実証研究の蓄積により、近縁種間における性的な相互作用、すなわち繁殖干渉が生態現象にきわめて大きな役割を果たしていることが知られるようになってきた。この現象は、異種間で生じる求愛や交尾がメスの繁殖成功度を低下させることにより、異種の影響を受けやすい少数派の種がより大きな影響を受け、さらに少数派となることを指す。繁殖干渉は頻度依存的に作用することから、容易に一方の種の排除をもたらす。このことを示す実証例も近年は蓄積されつつある。たとえば、資源をめぐる競争(資源競争)による排除の代表的な検証例として知られていたマメゾウムシ類 2 種間の関係は、現在では繁殖干渉の結果であったと認識が改められるに至っている(Kishi et al., 2009)。そのほかにも、外来種による在来種の排除等についても、繁殖干渉によるものであることを示す研究が多く発表されている(Takakura et al. 2009, Takakura and Fujii, 2010, 2015)。

一方で、種間の排除をもたらす生物間相互作用として、資源競争は現在でも主要な地位を占めていると認識されている。そのような認識の基礎となっている研究の代表例が、ゾウリムシ類を対象として行われた競争実験(Gause, 1934)で、競争排除の検証例として現在でも多くの教科書で参照されている。しかし、この研究では、ヒメゾウリムシとともに培養された場合にゾウリムシの密度が低下することを示してはいるものの、そのメカニズムが資源をめぐる競争であることを示したわけではない。この研究が行われた当時とは、上記の繁殖干渉に関するアイデアは存在しておらず、ゾウリムシ類で有性生殖が行われることも明らかになっていなかった。

マメゾウムシ類における排除が競争排除の検証であるとはみなされなくなった現在、ゾウリムシ類における排除のメカニズムについて再度検証を行う必要性が生じている。しかし、性的な相互作用という観点からゾウリムシ類の種間相互作用を検証する試みは行われていない。その背景には、現在の原生生物を対象とした研究は生態学以外の分野で盛んであり、生態学研究に適した方法論やその情報が整備されていないことが挙げられる。生態学、特に個体群生態学・群集生態学的な目的に適した方法論を開発し、その上で競争排除の再検証を行う必要がある。

## 2. 研究の目的

### (1) 競争実験に適した培養条件・細胞計数法の選定

競争排除を実証したとされる Gause (1934) から 1 世紀近くが経過しており、当時の培養条件の中には、そのまま再現すると効率的でない条件や、そもそも再現できないと考えられる条件等が存在する。たとえば、ゾウリムシ類が直接摂食する細菌として用いられていたのは病原性を有する緑膿菌であるほか、その培養に用いられたアガーは現在入手可能な製品よりも精製度が低かったと考えられ、同じ栄養条件を再現することは困難である。そのため、競争実験の再現にあたっては、これらの条件を見直し、競争実験に適した条件や方法論を開発する必要がある。

### (2) 2 種混合培養系における性の影響

繁殖干渉が生じる原因は、性的な種間相互作用による適応度コストであるものの、そのような種間相互作用が必ずしも種の置き換わりをもたらすわけではない。性的な種間相互作用が存在し、なおかつ適応度コストが伴ったとしても、そのコストが十分に弱い場合には種の置き換わりに至らない場合もありうる。そのため、Gause (1934) で示されたような種の置き換わりが生じるかどうかを検証するためには、異種との間に性的な相互作用が生じるかどうかという個体(細胞)レベルでの現象を観察するだけでは不十分で、個体群レベルでの動態に注目する必要がある。本研究でも Gause (1934) で行われたのと同様に、2 種のゾウリムシ類の混合培養系を作成し、その個体群(細胞数)の動態を記述することとした。この混合培養系における接合型(性)の組み合わせを変えることによって、性が 2 種個体群の動態に及ぼす影響を検出することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 競争実験に適した培養条件・細胞計数法の選定

培養条件の検討にあたり、ゾウリムシ類の餌となる細菌の一つとして *Klebsiella aerogenes* ATCC35028 株を用いた。この株を用いた理由は、病原性が低く、取扱いにあたって特別な設備等を必要としないこと、ゾウリムシ類の株の分譲元(ナショナルバイオリソースプロジェクト・ゾウリムシ研究室)でも用いられていることから、本研究の目的に適していると考えられたためである。また、食品検査における生菌数測定用として芽胞が市販されている枯草菌 *Bacillus subtilis* も用いた。

細菌およびゾウリムシ類を培養する液体培地として、複数種類の培地を比較検討した。原料の保存性がよく、ロット間差を最小化できるものとして、市販の大麦若葉粉末の抽出液、赤えんどう豆抽出液、無調整豆乳希釈液を作成し、*K. aerogenes* または *B. subtilis* を増殖させたうえでゾウリムシ類を導入し、細胞数の増加や観察に問題がないか検討を行った。

Gause (1934) の研究では、培養液から一部をサンプリングして、その中に含まれる細胞を顕微鏡下で数えたが、この作業工程自体がゾウリムシ類の死亡要因としてはたらくことで個体群動

態に影響を与えるほか、無染色での細胞の観察はコントラストが低く、多くのサンプルを処理するには不向きであるなどの問題が存在する。本研究では、培養液全量を対象として実施できるハイスループットな細胞計数法への応用を目的として、適切な細胞染色法を検討した。蛍光顕微鏡観察で一般的に用いられる DAPI のほか、光学顕微鏡観察で用いられるメチレンブルー・サフラニン・エオシン・ビスマルクブラウン・ヘマトキシリンなどを用い、染色性や観察や保存のしやすさなどを観点に検討を行った。また、観察を行う前処理としてのろ過法等についても検討した。

## (2) 2 種混合培養系における性の影響

Gause (1934)の研究が行われた時代には、ゾウリムシ *Paramecium caudatum* やヒメゾウリムシ *Paramecium aurelia* について性に相当する接合型が知られていなかっただけでなく、それぞれが単一の種であると考えられていた。その後、それぞれについて、互いに交配できない系統であるシンジェンが多数見出された。ヒメゾウリムシについては、それぞれのシンジェンが独立した種として記載されるに至っている。Gause (1934)で用いられたゾウリムシとヒメゾウリムシが、現在認識されているどのシンジェンないしは種であったのかは不明である。ゾウリムシの種とヒメゾウリムシの種はそれぞれ 16 と 14 であることから、その組み合わせの総数は 224 に及び、すべてを検証することは現実的ではない。本研究では、ゾウリムシとして分譲元が利用推奨株としている dYDRM-3E 株と dYDRM-3O 株（それぞれシンジェン 3 の E 型と O 型）および dOW-4E 株と dOW-4O 株（それぞれシンジェン 4 の E 型と O 型）を、ヒメゾウリムシとして標準株とされている ds4-2 (VIII)株と ds4-2 (VII)株 (*Paramecium tetraurelia* の E 型と O 型)を選び、用いることとした。

ゾウリムシのいずれかのシンジェン（3 または 4）と、ヒメゾウリムシをともに培養し、それぞれの細胞数の動態を調べた。いずれの種についてもいずれか一方の接合型を用い、すべての組み合わせを設けた。すなわち、ゾウリムシとヒメゾウリムシの接合型の組み合わせは、E×E、E×O、O×E、O×O の 4 種類を設けた。1~3 日おきに、遠心したうえで上澄みの培養液を交換することで、定期的な餌の補充を行った。それぞれ 40 日以上培養し、その間適宜サンプリングを行って細胞数を記録した。また、それぞれの種・接合型について単独での培養も行い、同様に細胞数の動態を調べ対照とした。

## 4. 研究成果

### (1) 競争実験に適した培養条件・細胞計数法の選定

用いたどの培養液においても、ゾウリムシとヒメゾウリムシの両種とも良好に細胞数が増えることを確認した。ただし、大麦若葉抽出液や無調整豆乳希釈液を用いた培養液では、培養日数が進むにつれて培養液中に沈殿物が生じることが多く、細胞観察の妨げになりかねないと考えられた。赤えんどう豆抽出液を用いた培養液では、各種の増殖が良好であるだけでなく、観察の妨げとなる沈殿物が少ないこと、培地調整の手間も少ないことなどを確認できた。また、簡易な培養液としては、酵母を原料とする市販の整腸剤（エビオス錠）を生理食塩水に浸漬したのち遠心して得た上澄み液も有効であると考えられた。

細胞の染色および計数法について検討した結果、1%ホルマリンで固定後に、サフラニンまたはメチレンブルーで染色し、ポリカーボネート製のメンブレンフィルタを用いて吸引ろ過した後、光学顕微鏡および撮影装置を用いる手法が有効であることを確認した。本法では、ゾウリムシとヒメゾウリムシの識別も可能な、きわめてコントラストの高いプレパラート写真を得ることができた。ホルマリン濃度がこれよりも小さい場合には細胞膜の破壊が生じることが多く、その他の染料（ヘマトキシリン・エオシン・ビスマルクブラウン）では、細胞が染まらないか、染まってもコントラストや彩度が十分高くなく、観察には適さなかった。また、蛍光染料の DAPI では核がよく染まったものの、保存した場合に徐々に蛍光が観察しにくくなる場合があり、ゾウリムシとヒメゾウリムシを識別するには適していないと結論付けられた。

### (2) 2 種混合培養系における性の影響

ゾウリムシのシンジェン 3 または 4 とヒメゾウリムシ *Paramecium tetraurelia* を用い、接合型の全ての組み合わせを設けた混合培養を行って、これら 2 種細胞の動態を観察した。その結果、いずれのシンジェンのゾウリムシを用いた混合培養においても、ヒメゾウリムシによるゾウリムシの競争排除は生じなかった。シンジェン 3 のゾウリムシを用いた混合培養では、ゾウリムシの接合型が O 型であるとき、ヒメゾウリムシの接合型にかかわらず、細胞数はほとんど増加しなかった（図 1）。ただし、40 日超の培養期間の間に排除されることもなかった。一方で、ゾウリムシの接合型が E 型であるとき、ヒメゾウリムシの接合型にかかわらず、ゾウリムシを単独で培養した場合と同様の密度に達し、この高密度は安定的に維持された。ヒメゾウリムシは、ゾウリムシとともに培養された場合と単独で培養された場合とで、細胞密度の違いはほとんどなかった（図 2）。シンジェン 4 のゾウリムシを用いた混合培養では、接合型の組み合わせによらず、ゾウリムシの密度がヒメゾウリムシよりも安定的に高くなった（図 3）。どの接合型の組み合わせにおいても、ヒメゾウリムシもゾウリムシも排除されることはなかった（図 4）。

ゾウリムシ - ヒメゾウリムシの相互作用系における競争排除は、生態学の黎明期より資源をめぐる競争による排除の代表例とされてきた。しかし、ヒメゾウリムシとの混合培養時に、利用

資源を同じくし生態的な特徴もほとんど違いのないゾウリムシのシンジェン間で個体群動態が異なるだけでなく、どの組み合わせでも排除が生じなかった。この結果は、この2種間の相互作用において、競争排除が少なくとも一般的な帰結ではないことを示している。さらに、ゾウリムシのシンジェン3のO型においては、ヒメゾウリムシとの混合培養によって細胞密度が低く抑えられたが、同じシンジェン3でもE型ではこのような現象は見られなかった。この傾向は、この2種間の相互作用において、接合型すなわち性が何らかの重要な役割を担っていることを示唆している。性がどのようなメカニズムで密度の動態に影響しているのかについては、より詳細な研究を行って確かめる必要があると考えられた。

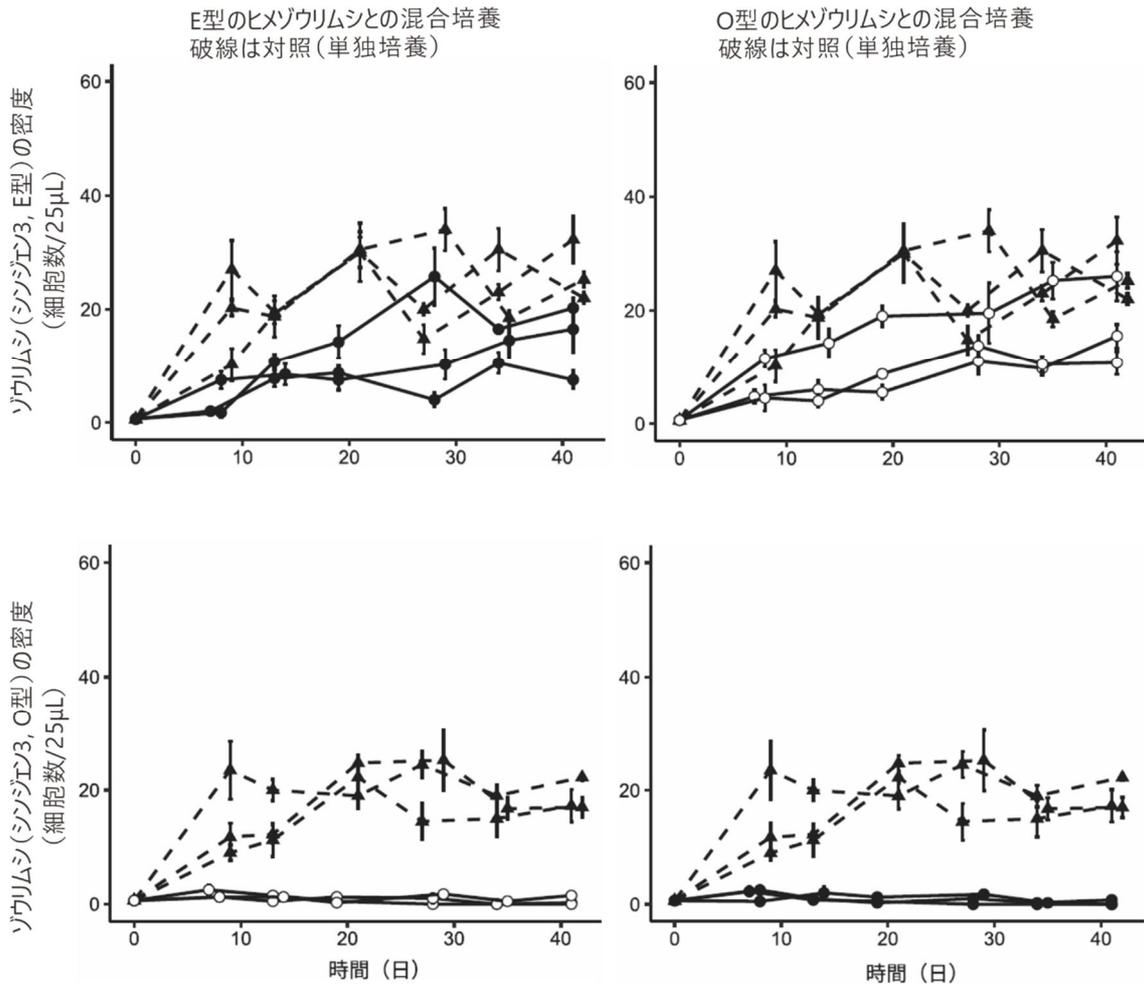


図1 ヒメゾウリムシとの混合培養におけるゾウリムシ(シンジェン3)の細胞数動態。

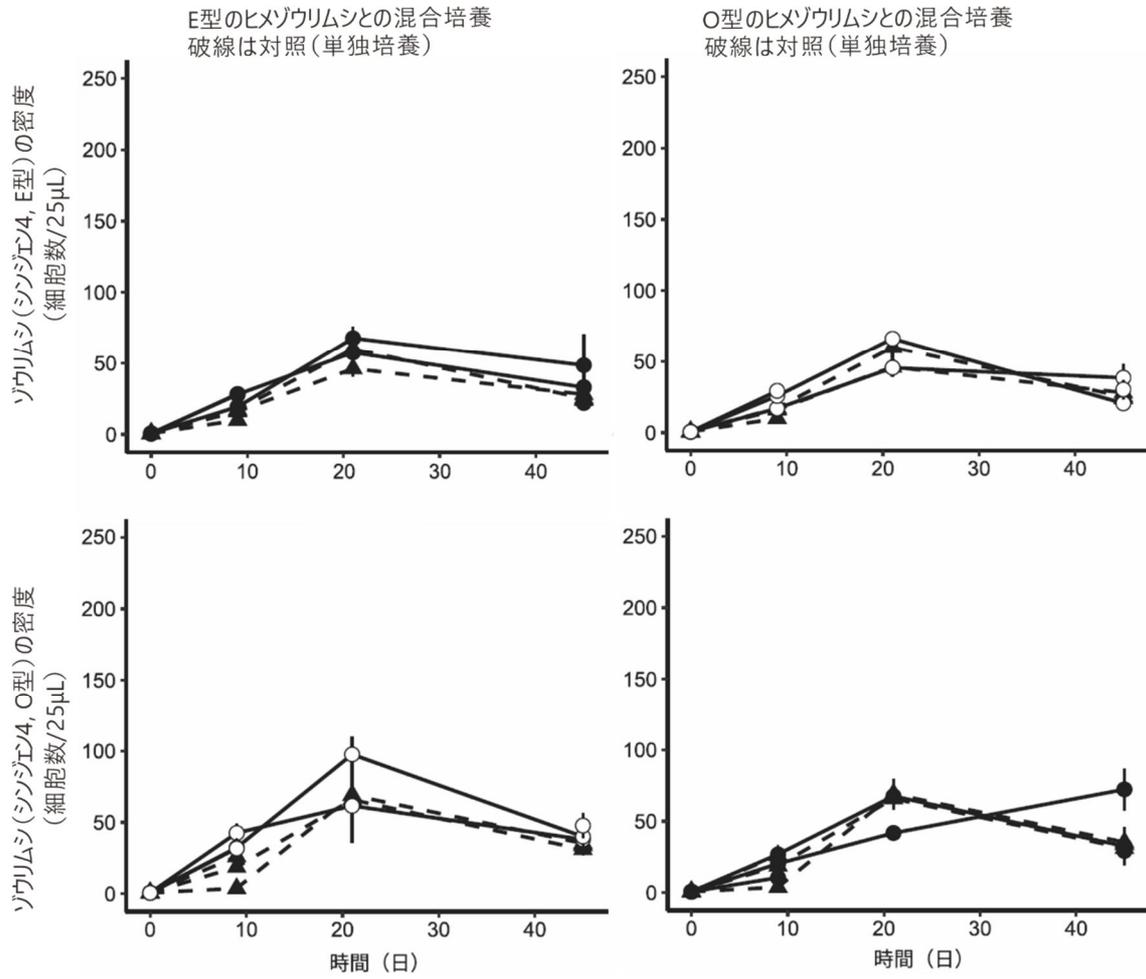


図2 ヒメゾウリムシとの混合培養におけるゾウリムシ(シンジエン4)の細胞数動態.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高倉耕一, 佐々木謙昌, 吉山洋子, 吉山浩平
2. 発表標題 競争排除則の再検討2: ヒメゾウリムシはゾウリムシを排除しない
3. 学会等名 日本生態学会第70回全国大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木謙昌, 吉山洋子, 吉山浩平, 高倉耕一
2. 発表標題 競争排除則の再検討: ゾウリムシとヨツヒメゾウリムシは同じ資源をとりあうか
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉山 浩平  (Yoshiyama Kohei)  (90402750)	滋賀県立大学・環境科学部・准教授   (24201)	
研究分担者	吉山 洋子  (Yoshiyama Yoko)  (80519968)	龍谷大学・農学部・実験助手   (34316)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------