

### バクテリア・コロニーのパターン形成

中大理工、新潟大医<sup>A</sup> 脇田順一、島田宏俊、伊藤裕人、松山東平<sup>A</sup>、松下貢

一般に、バクテリアのコロニーは種や環境条件によって様々な形を示す。大腸菌などのような通常のバクテリアは単細胞生物であり、栄養があれば適当な環境下において増殖を繰り返すことによって自分達の領域を広げて行く。ごく少数のバクテリア細胞でも、栄養を含んだ寒天培地の表面に接種すると、発育と分裂を繰り返してついには膨大な数の密集した細胞の集まり（2次元的なコロニー・パターン）を形成する。

本実験では、*Bacillus subtilis*（枯草菌）について、環境条件として栄養濃度と寒天濃度の2つの量をパラメータとして変化させたときに見られる、様々な特徴的なコロニー・パターンの成長機構について調べた。図1は、観察された特徴的なパターンをモルフォロジー・ダイアグラムとしてまとめたものである。順番に、自己相似なDLA（diffusion-limited aggregation）パターン（領域A）、成長界面が自己アフィンのEden的パターン（領域B）、同心円状パターン（領域C、図2参照）、一様等方なディスク状パターン（領域D）、枝別れの密なDBM（dense-branching morphology）パターン（領域E）のように分類することができた。<sup>1)</sup> これらのパターンのいくつかは、物理化学系でもしばしば見られることから、普遍的なパターン形成メカニズムが存在することが予想される。

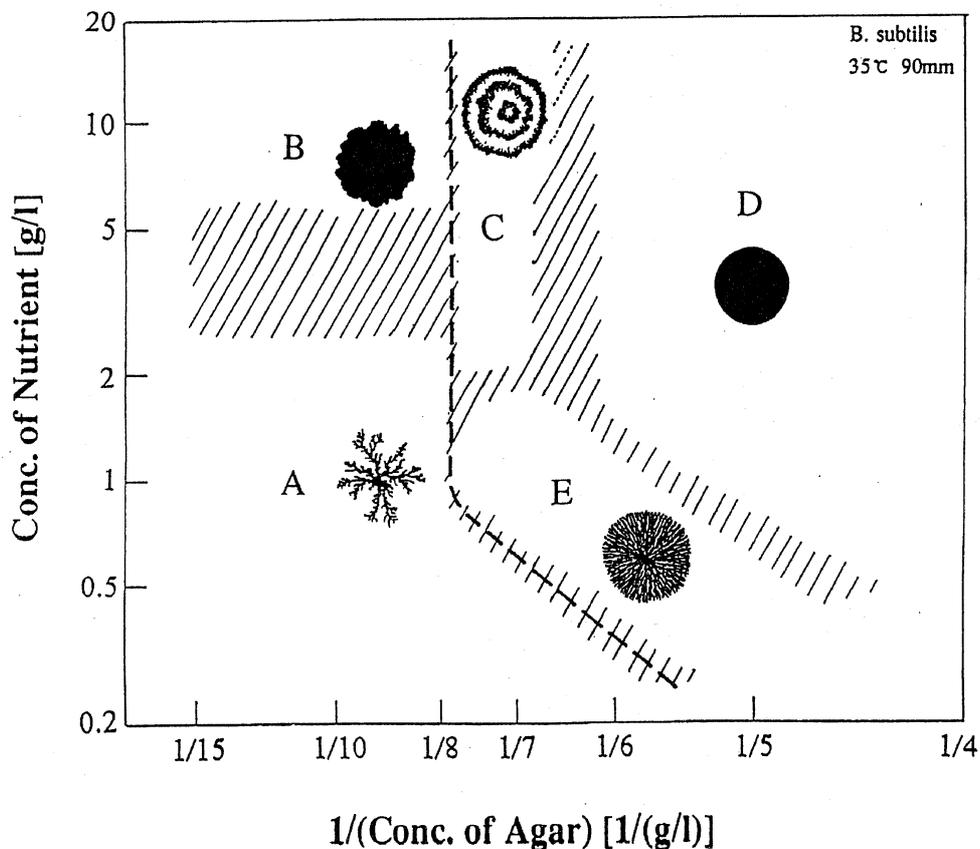


図1：枯草菌のモルフォロジー・ダイアグラム

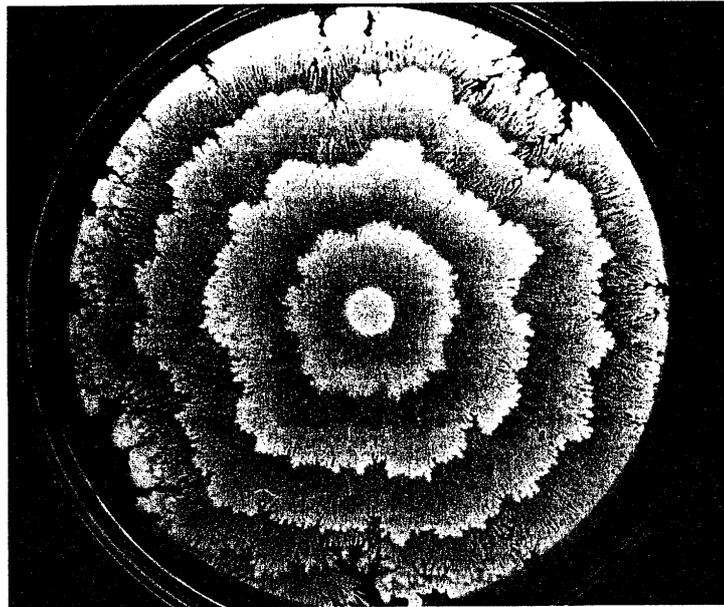


図2：枯草菌の同心円状パターン（領域C）

光学顕微鏡を用いてコロニー内部を観察して見ると、寒天が固い領域AとBではコロニーが成長しつつある界面のところで個々のバクテリアが能動的に動き回る様子はまったく見られない。また、成長・分裂した細胞は分離しないので、界面を構成するバクテリア細胞は一連のソーセージのようであり、それらが束になって成長するために、領域Bで見られるような特徴的な自己アフィン界面が形成される。他方、領域C、D、Eでは寒天が柔らかいため、コロニー界面近傍のバクテリアは活発な運動性を示す（図1の破線は能動的運動の有無の境界を表わしている）。領域Dではバクテリアは一様等方に広がるだけであるが、領域Cでは広がり（migration）と停止（consolidation）を周期的に繰り返す、結果として特徴的な同心円状コロニーを形成する。これは一見、領域BとCにおける成長を交互に繰り返しているようにも見える。また、領域Eでは成長している枝の先端部に特に活発に運動するバクテリアが集中して指の爪のような構造をとっており、それが枝の先端の成長を駆動している。

このように、コロニー形成の際の環境条件として栄養濃度と寒天濃度を変えるだけでも、コロニー・パターンは大幅にかつ定性的に変化することがこれまでの実験により明らかになった。我々の目標は、これらのコロニー・パターン形成機構を巨視的な立場から理解することである。バクテリアが活発に動き回ったり増殖したりする、という性質は生物固有のものであるために、その性質によって誘発されるコロニー・パターンは一般的に複雑なもののように考えられる。しかし、本実験におけるようにそれらの性質が栄養濃度や寒天濃度の関数としてコントロールされるならば（栄養が豊富であるほど頻繁に増殖し、寒天が柔らかいほどバクテリアは動きやすい）、物理の問題として考えることの可能性が期待できる。特に、D領域で見られる一様等方なディスク状コロニー・パターンの内部では、寒天が柔らかいためバクテリアは活発な運動性を示し、さらに栄養分も豊富なために頻繁に増殖を繰り返している。我々は、バクテリアの運動をブラウン運動と見なすことによって、D領域のコロニー・パターンの成長機構がフィッシャー方程式の解の振る舞いと矛盾しないことを確かめることができた。

今回の発表では、C領域で見られる同心円状コロニー・パターンに着目した（図2参照）。同心円状パターンは、化学反応におけるベロゾフ・ジャボチンスキー（Belousov-Zhabotinsky ; BZ）反応やゲル中の結晶成長におけるリーゼガング・リング

(Liesegang ring) などが知られているが、細菌のつくるコロニー・パターンとしては *P. mirabilis* という種の菌が巨視的にはほとんど完璧に同心円に見えるコロニーをつくることで有名である。我々は、まず最初にこの C 領域で見られる同心円状コロニーのマクロな特徴として、コロニー界面が進行中の時間 (migration time) と停止中の時間 (consolidation time)、それらの和の時間 (cycle time)、同心円の空間的間隔 (W) が栄養濃度と寒天濃度の関数としてそれぞれどのように変化しているかについて調べた。その結果、栄養濃度を变化させた場合についてはそれらの量はほぼ一定であることが確かめられた (図 3 (a), (b) 参照)。一方、寒天濃度を变化させた場合は、図 1 のモルフォロジー・ダイアグラムをみても明らかのように寒天濃度の軸に対して非常に狭い範囲内では同心円状コロニーは見られないものの、それらの量の変化は大きく、寒天が柔らかいほど migration time は長く、consolidation time は短くなり、空間的間隔 (W) は広くなる傾向があることがわかった (図 4 (a), (b) 参照)。

本実験で用いた菌株はサーファクチンと呼ばれる界面活性作用をもつ物質を分泌し、それは一般に細菌が寒天培地上のような 2 次元平面を動き回るときに、より動きやすくする働きをしている。そこで、サーファクチンのコロニー・パターン形成に対する影響を調べるために、サーファクチンを分泌しないミュータントを用いて同様の実験を行った。

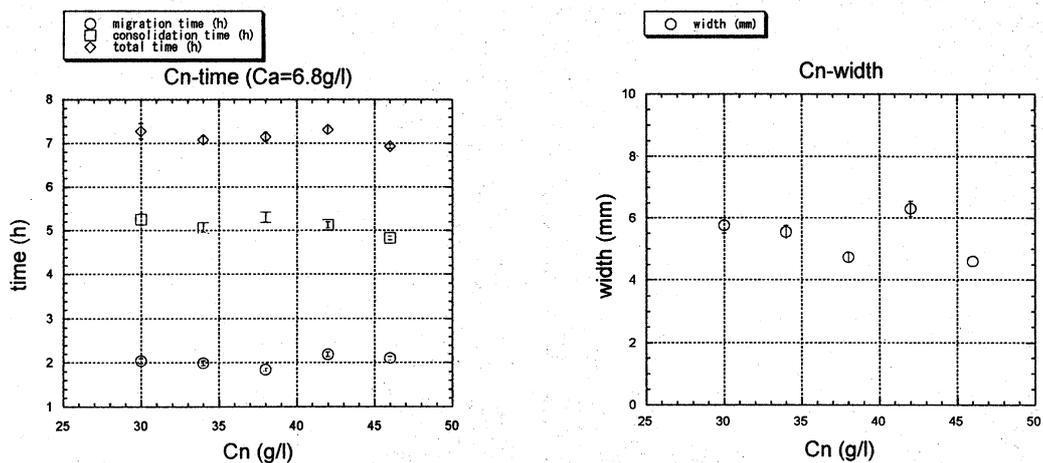


図 3 (a) migration time、consolidation time、cycle time の Cn 依存性 (b) 同心円の空間的間隔(W)の栄養濃度 Cn 依存性

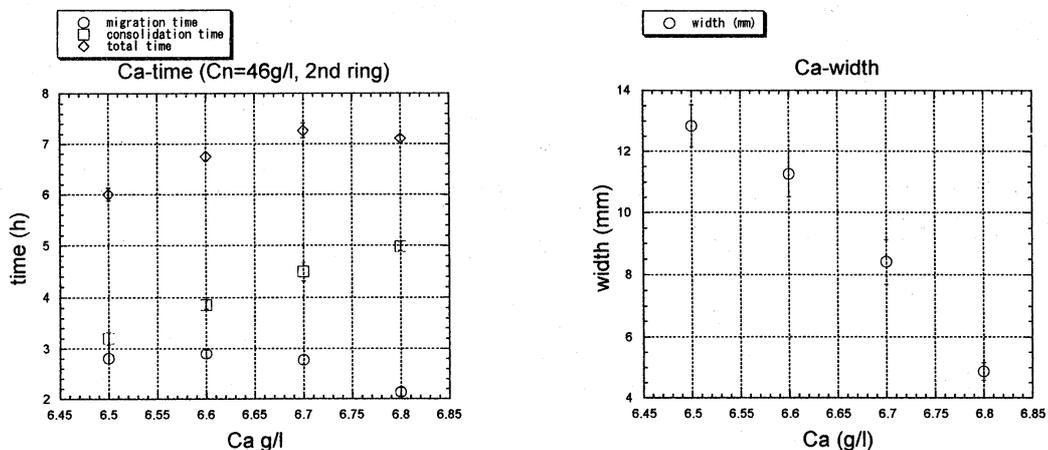


図 4 (a) migration time、consolidation time、cycle time の Ca 依存性 (b) 同心円の空間的間隔(W)の栄養濃度 Ca 依存性

その結果、サーファクチンの有無にかかわらずミュータントの菌株でも同心円状のコロニーが形成されることがわかった。

さらにレプリカ・プリントの実験を行った。これは、まず2つの寒天培地を用意し、その一方に菌を摂取して培養する。そして2回目の migration もしくは consolidation が始まったときに、外側のテラス部分を切り取ってそれを余ったもう一方の新しい培地上にプリントする。それら2つの培地を一緒に培養し、その後のコロニー形成における時間的な周期性を比較するというものである。結果は、新しい培地の方では migration 中にプリントするか consolidation 中にプリントするかによらず、接種後まもなく migration を始めることが確かめられた。すなわち時間的な周期性にメモリー効果はないということがわかった。

これらの結果から言えることは、何らかの環境の変化の影響、もしくは集団としての構造のようなマクロなレベルの問題として、この同心円状コロニー形成の問題を考えることができそうであるということである。

今後は、光学顕微鏡を用いてコロニー形成過程をミクロなレベルで詳しく観察していくことが大切であると思われる。

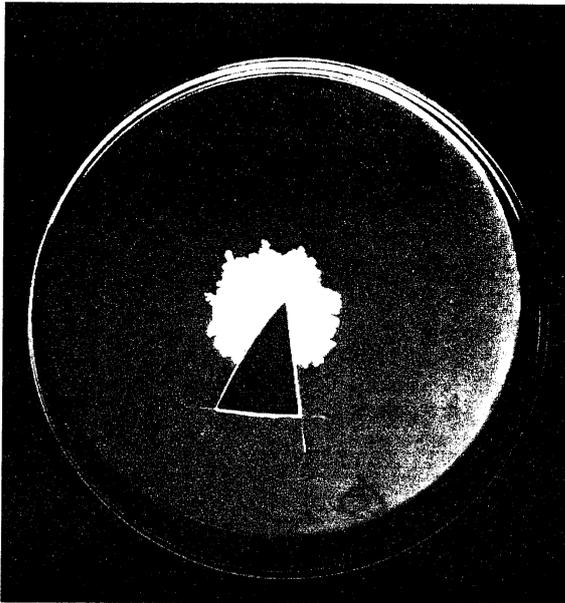
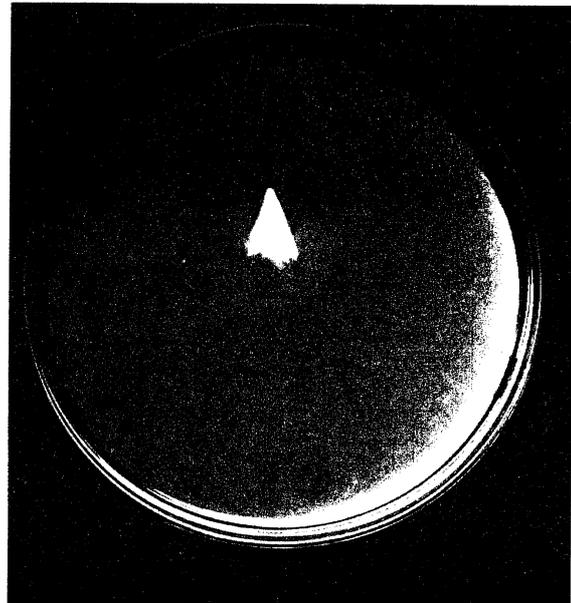


図5(a) オリジナルな培地。Consolidation 中に切り取ってから1時間後。まだ consolidation 中である。



(b) 新しい培地。プリントしてから1時間後。すでに migration に入っている。

#### 参考文献

- 1) M. Matsushita, in *Bacteria as Multicellular Organisms*, eds. J. A. Shapiro and M. Dworkin (Oxford Univ. Press, New York, 1997) pp. 366-393.