

枯草菌の密集分岐形態コロニーの環境 pH 依存性

Environmental pH dependence of dense branching morphology-like colonies of *Bacillus subtilis*

中山 まどか¹, 田崎 創平^{2,3}, 東海林 亙^{2,4}

¹ 仙台高等専門学校総合科学系理数科

² 東北大学学際科学フロンティア研究所

³ 東北大学大学院理学研究科

⁴ 東北大学加齢医学研究所

Madoka Nakayama¹, Sohei Tasaki^{2,3}, Wataru Shoji^{2,4}

¹Sendai National College of Technology

²Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences (FRIS), Tohoku University

³Graduate School of Science, Tohoku University

⁴Institute of Development, Aging and Cancer (IDAC), Tohoku University

1. はじめに

多くの生物がそうであるように、微生物はしばしば固体の表面に生息している。食物、他の生物組織、排水管などの人工建造物、土壌などである。液体中や気体中のような浮遊環境における個々の細胞の自由な振る舞いと比して、固体表面環境では細胞の移動は著しく制限される⁽¹⁾。その結果、微生物は自分の周囲の限られた資源にしかアクセスできず、好ましくない状況から脱することも困難である。必然的に、固体表面の微生物社会には適切な成長生存戦略が要求され、形成されるコロニーはその戦略を体現していると思われる⁽²⁾。本稿では、枯草菌の2次元集団運動が生み出すコロニー形態が、環境 pH の変動に応じて非常に繊細に変化することを報告する。

2. 枯草菌コロニーの形態

枯草菌は、土壌など自然界に普遍的に存在する真正細菌で、好気性のグラム陽性桿菌である。納豆の製造をはじめ、胃腸薬や土壌改良剤、洗剤の材料として我々の生活の中で役立っている。細胞は短軸 0.7-0.8 μm 、長軸 2-3 μm 程度の細長い棒の形をしている。枯草菌の大きな特徴として芽胞の形成が挙げられる。好ましい環境では栄養細胞の形で増殖と運動を行いながら活動を行うが、悪環境では芽胞とよばれる非常に耐久性の高い細胞構造へと移行し、増殖や運動は停止する。本稿で扱う野生型 OG-01 株⁽³⁾もこのような特徴を備え、また、豊富なコロニー形態を呈することが知られている^(4,5)。栄養寒天培地上に形成されるこの株のコロニー形態は、古典的には5種類に分類される。すなわち、いわゆる Eden 的パターン⁽⁶⁾、拡散律速凝集 (Diffusion Limited Aggregation (DLA)) 的パターン^(7,8)、円盤状パターン、密集分岐形態 (Dense Branching Morphology (DBM)) 的パターン⁽⁹⁻¹¹⁾、そして周期的成長による同心円状パターンである。これらは培地に含まれる栄養 (ペプトン) および寒天の濃度により、形態ダイアグラムにまとめられた^(4,5)。一方で著者らは、コロニー先端に壁構造を作るクレーター状パターンなど、これまでの分類に当てはまらない新規形態を最近発見している⁽¹²⁾。本稿では特に、前述の5種類のコロニー形態のひとつである DBM 的パターンの形成に着目して、新しい環境感受性について議論する。

3. DBM 的パターンの形成

寒天濃度が 0.4% から 0.6% 程度の栄養寒天培地上では、枯草菌はプレート内部に潜り込むことは (ほぼ) ないが、豊富な表面水分のおかげで極めて活発な 2 次元的集団運動を示す。培地内部を泳ぎ回ることでより低い寒天濃度のいわゆる soft agar と照らし合わせて、semi-soft agar とよんで差し支えない培地条件である。この培地表面の乱流のような集団運動はしばしばスウォーミング (swarming) とよばれる。コロニーの 2 次元的展開を促し、コロニーの厚みをほぼ細胞 1 層にすることも多い。そして、栄養が少ない、例えば 0.4 g l^{-1} 程度のペプトン濃度の場合、コロニーの 2 次元形状は前述の DBM 的パターンとなる。最適な条件からある程度大きく離れるような環境変動を与えない限り、この semi-soft agar とよぶべき寒天濃度では集団的なスウォーミングが起き、コロニ

一形態は円盤状あるいは DBM 的である、というのが一般的な考え方であると思われる。この場合のコロニーの展開は非常に速く、直径 90 mm 程度のプレートを 1～2 日で埋め尽くしてパターン形成が終了するほどである。ところが、環境条件を適切に調節すると、むしろ最適な環境条件付近において、集団運動が制限されて DBM 的パターン (あるいは円盤状パターン) がうまく形成されないことがある。本稿ではこの現象について報告する。

4. DBM 的パターンの生成確率と環境 pH

まず、実験方法について簡単に述べる。枯草菌は野生型 OG-01 株を用いる。培地はペトリディッシュ (BD Falcon Petri Dish, BD Biosciences, cat. no. 351029) 内に栄養寒天培地を作成した。

栄養寒天培地は以下の手順で準備した。ペプトン (Bacto Peptone, BD Biosciences, cat. no. 211677) 0.4 g l⁻¹、塩化ナトリウム 5 g l⁻¹、りん酸水素二カリウム 5 g l⁻¹ の液体培地を作成し、2.4 mol l⁻¹ 塩酸を用いて pH を調整する。その後、5 g l⁻¹ の寒天 (Bacto Agar, BD Biosciences, cat. no. 214010) を加えて、121°C、15 分の設定でオートクレーブ滅菌した後、前述の滅菌ペトリディッシュに 20 ml ずつ注ぎ、冷却・固化した。翌日に各ペトリディッシュの蓋を開けて 50°C に設定した恒温器にて培地を 30 分乾燥した。

次に、接種に用いた枯草菌は、LB 培地 (LB Broth Base (Lennox L Broth Base), Gibco BRL Life Technologies, cat. no. 12780-052) にて一晩事前培養したものである。遠心分離し、適当な緩衝溶液で細菌濃度を調節した細菌懸濁液を作成し、培地表面中央に白金耳を用いて一点接種した。接種した細胞はプレート 1 枚当たり約 10⁵ 個である。接種後、温度 35°C、湿度 90% に設定した恒温器にて培養した。形成されたコロニーは顕微鏡、フラットスキャナー、デジタルカメラ等を用いて観察・データ保存する。

前節でも述べたように、DBM パターンが形成されるときは 1～2 日でコロニー成長が終了する。そこで、接種から 2 日後の代表的なコロニーの写真を図 1 に示した。pH 7.6、7.5 や 7.1 など DBM パターンが形成されるが、間の pH 7.2～7.4 では形成に失敗することが多い。また、pH 7.6、7.5 付近で見られる DBM パターンでは枝が細く、密で、やや渦を巻いたような形であるのに対して、pH 7.1 付近の DBM パターンは枝がやや太く、渦を巻きにくいようである。すなわ

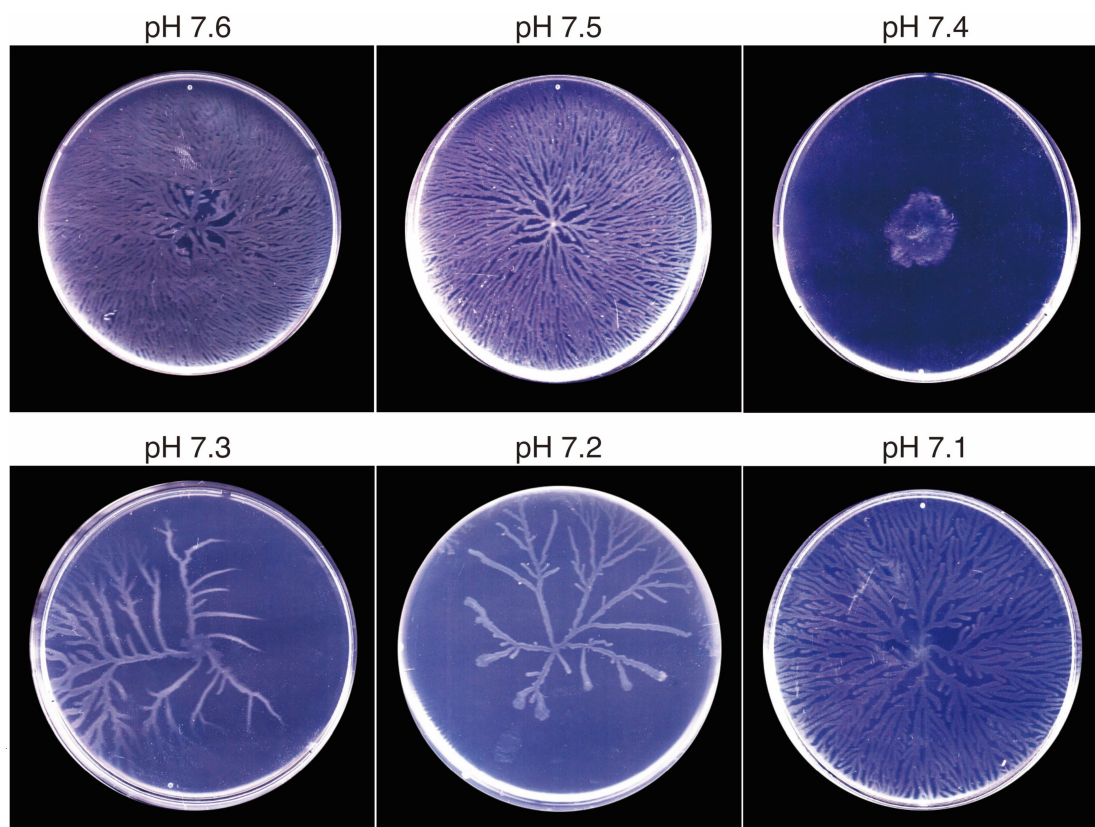


図 1： 環境 pH と代表的コロニー形態。接種 2 日後のコロニーをスキャンした画像に同じコントラスト処理を施した。

ち、DBM パターン生成の成否は環境 pH に繊細に依存し、また生成された場合であっても、環境 pH によって枝の太さなどの DBM パターンの詳細に差異があることが分かった。

DBM パターンの生成率について表 1 にまとめた。この表より、pH 7.6 から pH を下げていったときのコロニーパターン形成の変化を考察する。まず、pH 7.6 で 90.9%、pH 7.5 で 94.1% という高確率で DBM 的パターンが形成された。ところが、pH 7.4 になると急激に形成率が下がり、DBM 無形成率は 82.3% である。その後の pH 7.3、7.2 では DBM 形成率がやや回復し、部分的 DBM 形成率が 40% を超えている。そして pH 7.1 にもなると再び 90.9% という高確率で DBM パターンが生成された。

このように、わずかな環境 pH の変化が DBM パターン形成率に強く影響を及ぼしていることが分かった。また、pH 減少に対して、DBM パターン形成率は下降した後再び上昇しており、環境 pH の影響は単調ではないことが明らかになった。

pH	完成 DBM	部分的 DBM	無形成	総数
7.6	10 90.9%	0 0.0%	1 9.1%	11
7.5	16 94.1%	0 0.0%	1 5.9%	17
7.4	1 5.9%	2 11.7%	14 82.3%	17
7.3	2 11.7%	8 47.1%	7 41.2%	17
7.2	2 11.7%	7 41.2%	8 47.1%	17
7.1	10 90.9%	1 9.1%	0 0.0%	11

表 1: DBM パターン生成率の環境 pH 依存性。ここで、「完成 DBM」とは培地表面全体を枝が埋め尽くした状態をいう。「部分的 DBM」は、完成 DBM ではないが、枝が 1 本でも培地の端に到達したものをいう。「無形成」は完成 DBM でも部分的 DBM でもないものを意味する。

5. まとめと今後

DBM 的コロニーパターン形成と環境 pH の関係はこれまで調べられていなかったが、本研究により繊細で非単調な相関が明らかになってきた。しかし、DBM パターンの形成の成否がはっきりしない再現性の微妙な条件、例えば形成率 50% 付近などではどういったことが起きているのであろうか。これに関しては、細菌の活動、特にコロニー展開初期の細胞活動が揺らぎ、周囲微小環境に与える影響が変動していることが鍵であると考えている。実際、周囲微小環境に与える影響を最小限にする工夫をした最近の実験では、DBM 生成の成否がはっきりした再現性の良い結果が得られている。今後は、わずかな環境条件の差で DBM 生成の成否がなぜ異なってくるのか、集団戦略的意図とメカニズムについて明らかにしていく予定である。

参考文献

1. Kearns, D. B., "A field guide to bacterial swarming motility", *Nature Rev. Microbiol.* **8**, 634-644 (2010).
2. Ben-Jacob, E., Cohen, I., Levine, H., "Cooperative self-organization of microorganisms", *Adv. Phys.* **49**, 395-554 (2000).
3. Fujikawa, H., Matsushita, M., "Fractal growth of *Bacillus subtilis* on agar plates", *J. Phys. Soc. Japan* **58**, 3875-3878 (1989).
4. Ohgiwari, M., Matsushita, M., Matsuyama, T., "Morphological changes in growth phenomena of bacterial colony patterns", *J. Phys. Soc. Japan* **61**, 816-822 (1992).
5. Wakita, J., Komatsu, K., Nakahara, A., Matsuyama, T., Matsushita, M., "Experimental investigation on the validity of population dynamics approach to bacterial colony formation", *J. Phys. Soc. Japan* **63**, 1205-1211 (1994).
6. Eden, M., "A two-dimensional growth process", in *Proceedings of the Fourth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, Volume 4: Contributions to Biology and Problems of Medicine, Berkeley, USA, 20 June-30 July 1961* (ed. Neyman, J.) 223-239 (University of California Press, Berkeley, 1961).
7. Witten, T. A., Sander, L. M., "Diffusion-limited aggregation, a kinetic critical phenomenon", *Phys. Rev. Lett.* **47**, 1400-1403 (1981).
8. Matsushita, M., Fujikawa, H., "Diffusion-limited growth in bacterial colony", *Physica A* **168**, 498-506 (1990).
9. Wakita, J., Ráfol, I., Itoh, H., Matsuyama, T., Matsushita, M., "Experimental investigation of dense-branching-morphology-like colonies in bacteria", *J. Phys. Soc. Japan* **67**, 3630-3636 (1998).
10. Ben-Jacob, E., Deutscher, G., Garik, P., Goldenfeld, N. D., Lareah, Y., "Formation of a dense branching morphology in interfacial growth", *Phys. Rev. Lett.* **57**, 1903-1906 (1986).
11. Ben-Jacob, E., Garik, P., "The formation of patterns in non-equilibrium growth", *Nature* **343**, 523-530 (1990).
12. Tasaki, S., Nakayama, M., Shoji, W., submitted.