

環境 pH 変動に対する枯草菌コロニーの形態変化とその優位性

Morphological changes and their advantages in *Bacillus subtilis* colonies responding to environmental pH variation

田崎 創平^{1,2}, 中山 まどか³, 東海林 亙^{1,4}

¹ 東北大学学際科学フロンティア研究所

² 東北大学大学院理学研究科

³ 仙台高等専門学校

⁴ 東北大学加齢医学研究所

Sohei Tasaki^{1,2}, Madoka Nakayama³, Wataru Shoji^{1,4}

¹ Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences (FRIS), Tohoku University

² Graduate School of Science, Tohoku University

³ Sendai National College of Technology

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

1. はじめに

枯草菌は環境に応じて多様な集団形態を呈する [1-3]。また、適当な条件下では頑強なバイオフィーム構造を形成する [1, 4]。このような集団形態の多様性とバイオフィーム構造の頑健性を支えているのが、枯草菌の細胞ダイバーシティである [5]。枯草菌は環境条件や自身の細胞密度情報、コロニー内の部位などに応じて異なる細胞タイプを選択する。そして、各々の細胞タイプの形成する部分集団は、環境変化に応じて非常に細やかに活動を調節する。さらに、これらの集団間の分業によって、コロニー全体の頑健な成長を実現している。特に多様な細胞タイプからなるバイオフィームの構造は、様々な機能を実現して長期

生育を可能としている。

環境変動と枯草菌の集団形態の関係は、これまでに多くの研究がなされてきた [1]。著者らは特に環境 pH に対する形態的応答を調査してきた [1, 2, 9]。本稿では、環境 pH 変動に対する 2 つのコロニー形態変化を取り上げ、形成原理と形態の優位性を議論する。

2. 環境 pH 低下に備えるクレーター型防御形態

寒天が 1% 程度あるいはそれ以上含まれる表面水分の少ない栄養寒天培地上では、分厚いコロニーが形成される。大部分の細胞が基質産生タイプであり、運動しない状態にある。したがって、コロニー形態の形成機構は増殖のみによって理解され、運動性は寄与しないと考えられてきた。しかし最近著者らは、この分厚いコロニーの内部細胞分布構造と展開速度に運動性が大きな影響を与えることを報告した [2]。ここで、環境 pH が 7.4 からわずかに低下すると、コロニーの形態が急激に、だが連続的に変化し、pH 7.0 付近ではコロニー境界に細胞が集積するクレーター状の形態が形成されることが見出された。さらに、この形態変化は、運動性、とりわけ、栄養への走化性の用量応答を環境 pH によって制御するという間接的機構によって実現されていることが明らかになった。この機構をより詳しく述べると以下の通りである。まず、環境 pH の低下に応じて栄養走性を高める。そして、残存栄養濃度がやや低めになっているコロニーの境界よりやや内側の部位において、コロニー外側方向へと向かう栄養走性がピークをもつように、栄養用量・応答の関係を設計する。これらが組み合うことで、環境 pH が低下したときに、コロニー境界に細胞を集積してクレーター型形態を形成・維持している。

ここで pH 7.4 というのは枯草菌の細胞内 pH である [6]。外部環境の pH が少なくとも 6–8 の範囲では、細胞内は pH 7.4 に保つ恒常性があり、この意味で pH 7.4 は最適 pH であるといえる。この最適 pH からわずかに酸性側に傾いたときに、クレーター型の形態をとる意義は何であろうか。まず最初に考えられるのは悪環境からの直接的な退避（負の走性）である。しかし、クレーター型コロニー形成の状況で、最適 pH に近いのはむしろコロニー内側方向である（図 1a）。より大きな pH 勾配に対しては直接的な移動が働くが [7]、この場合のよう

なわずかな pH 低下には当てはまらない。この場合のように、大きな脅威ではなく、小さな変化が起きたときの成長生存戦略として考えられるのが、事前防御策である。我々人類も高波が来れば直ちに逃げ出すが、それほどでもない海面上昇であれば、堤防を築いて高波に備えて様子を見る。そこで、このクレーター型形態のコロニーの境界部の構造が、環境の酸性変化に備えられているのかを調べた。すると、短期的に大きな酸性変化がコロニー周囲で起きたとき、入り組んだ境界では成長先端が大きく内側に後退するが、主にクレーター型コロニーの境界に多く見られる閉じた壁構造の付近では、成長領域を保持できることが分かった (図 1b)。したがってこの形態変化は、酸性度変化の兆しを感じ取り、来る大きな環境変動に備えて防御構造をとっているのだと考えられる。さらに、コロニー成長先端に細胞を集めることで栄養利用率が高まっており [8]、安定して壁構造を拡大していく持続的な成長戦略が実現されている。

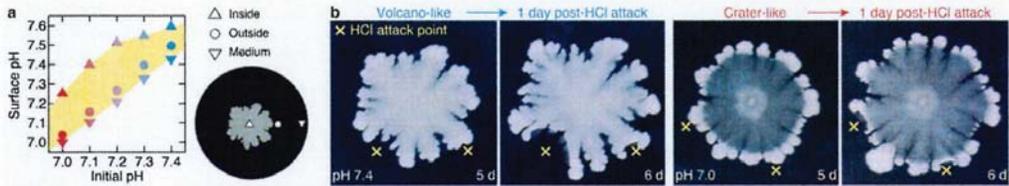


図 1: 環境 pH 変化とコロニーの防御性能。a, 接種 5 日後における表面 pH の分布。コロニー内部方向に向かって pH は上昇している。b, 短期的 pH 変動に対するコロニー形態の防御性。接種 5 日後のコロニーに対して、コロニー境界のすぐ外側の x 印の点に 10 μ l の 2.4 g l⁻¹ 塩酸を滴下した。塩酸はすぐに培地内を拡散するが、少量のために長期的な pH 変化は 0.04 未満で無視できる程度である。すなわち、短期的な環境変動の影響を調べた。主にクレーター型形態によく見られる壁構造の付近では被害 (成長先端領域の細胞のコロニー内側への回避) が小さい。

3. 最適 pH で運動抑制するレース模様型定住形態

寒天濃度が 0.4% から 0.6% 程度の栄養寒天培地は、枯草菌が内部に潜り込むことのない「固体」培地としてはちょうど境界に位置し、もっとも柔らかく表面

水分の多いものである。この豊富な表面水分のおかげで、枯草菌の細胞はほとんどが運動タイプをとり、培地表面上でスウォーミングとよばれる平面集団運動を示す [9]。この集団運動がコロニーの厚みをほぼ細胞 1 層にし、コロニーの 2 次元展開を非常に強く促進する。その結果、直径 88 mm のプレート表面を埋め尽くすのに 1 日とかがからない。また、コロニーの形態は、培地に含まれる栄養量によって変化する。栄養が十分多ければ円盤状であり、少ないときは密集分岐形態 (Dense Branching Morphology (DBM)) 状となる [10]。以下では、DBM 状コロニーが形成される栄養が少ない条件に着目する。以前に、中性 pH 域において DBM 状コロニーの形成に失敗することがあることを報告した [11]。再現性の高い条件を構築するため、コロニー展開初期に接種点周囲の微小環境の条件が変わらないように、接種する栄養細胞数をできるだけ少なく、一定にした。すると、最適 pH 7.4 付近でのみ、これまでとまったく異なる、レース模様型のコロニーが形成されることが分かった (図 2) [1]。

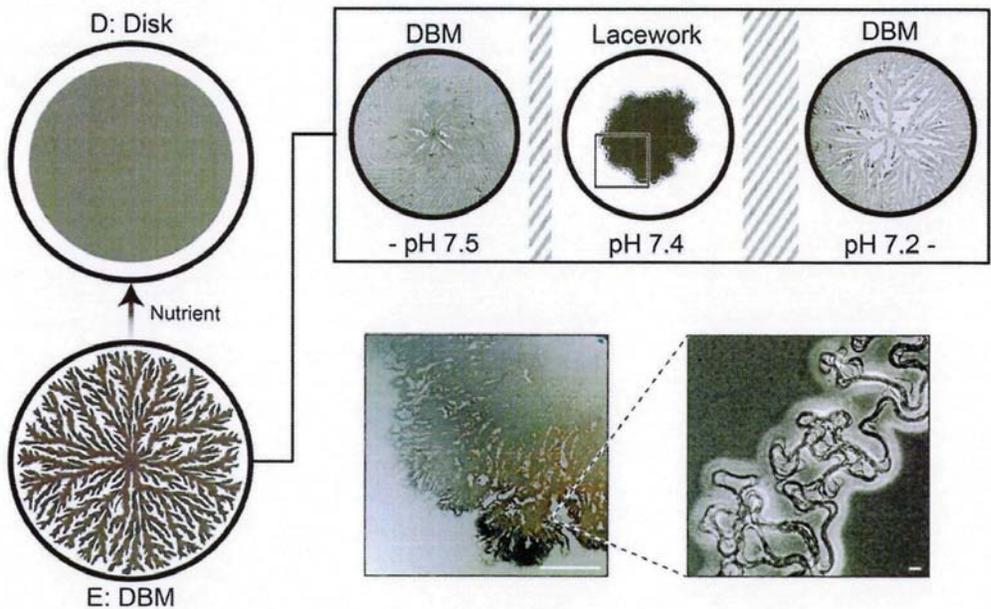


図 2: 寒天濃度 0.5% の栄養寒天培地上のコロニー形態 [1]。基本的にはスウォーミングによる極めて展開の速いコロニー成長パターンとなるが、pH 7.4 付近ではスウォーミングせず、レース模様型の定住形態をとる。スケールバーは 1 cm (左)、10 μm (右)。

このレース模様型のコロニーの成長は非常に遅く、1ヶ月でやっと直径 88 mm のプレートの半分に到達する程度である。1日足らずで展開終了する DBM 状や円盤状コロニーと比べるとその差は絶大である。レース模様型コロニーを顕微鏡で見ると、ほぼすべての細胞が基質産生タイプであり、運動していないことが分かる。基質産生タイプの細胞は、栄養を摂取して細胞分裂するが、基質等によって分離せず、髪の毛がのびていくかのように増殖する。寒天濃度の低いスウォーミング領域では、表面水分のおかげで摩擦が少なく、増殖する連鎖細胞群は平面的に展開していく。これがレース模様型形態の形成原理であると考えられる。実際、細胞ごとの個別要素法的な数理モデルを構築することによって、レース模様形成を確認している。最適 pH で基質産生の細胞タイプを選択するための制御機構については、おそらく部分的には理解できる段階であると思われるが [12, 13]、ここでは割愛する。

このレース模様型成長形態の優位性は、定住的であることと考えられる。移動コストが小さいスウォーミングできる条件の培地であっても、環境 pH をはじめとするいくつかの条件が適しているときには、運動を抑制し、定住的パターンを選択するわけである。運動コストの節約によって、DBM 状成長形態より高い細胞密度・防御性が期待される。

4. まとめと今後

環境 pH 変動に対する枯草菌の細胞集団の形態的応答について 2 つ取り上げ、形成機構および優位性について述べた。それぞれ、環境 pH 低下に対する防御形態と、最適 pH における定住形態の構築である。これらの形態変化の機構としての大枠は説明できたが、環境 pH の情報を細胞がどのように処理しているのかが不明である。この点では主に細胞タイプを制御する分子ネットワークに着目し、環境 pH への応答を司る部分ネットワークを抽出するべく解析を進める予定である。また、バイオフィーム構造の中での pH 応答の役割も考えられ、現在調査中である。いずれにせよ、このような柔軟な集団的応答を可能とする成長設計が、進化の中でどのように獲得されたのかは興味深く、動的環境下で進化する細胞集団の数理モデルを作成して考察していくことを計画している。

謝辞

本研究は MEXT 科研費 (No. 17H06327) の助成を受けたものである。

参考文献

- [1] Tasaki, S., Nakayama, M., Shoji, W. 2017. Morphologies of *Bacillus subtilis* communities responding to environmental variation. *Dev Growth Differ* **59**, 369-378.
- [2] Tasaki, S., Nakayama, M., Shoji, W. 2017. Self-organization of bacterial communities against environmental pH variation: Controlled chemotactic motility arranges cell population structures in biofilms. *PLoS ONE* **12**, e0173195.
- [3] Wakita, J., Komatsu, K., Nakahara, A., Matsuyama, T., Matsushita, M. 1994. Experimental investigation on the validity of population dynamics approach to bacterial colony formation. *J Phys Soc Japan* **63**, 1205-1211.
- [4] Branda, S. S., Gonzalez-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11621-11626.
- [5] López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. 2009. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 152-163.
- [6] Shioi, J., Matsuura, S., Imae, Y. 1980. Quantitative measurements of proton motive force and motility in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **144**, 891-897.
- [7] Tso, W.-W., Adler, J. 1974. Negative chemotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **118**, 560-576.
- [8] Liu, J. *et al.* 2015. Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms. *Nature* **523**, 550-554.
- [9] Kearns, D. B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Rev Microbiol* **8**, 634-644.
- [10] Wakita, J., Råfols, I., Itoh, H., Matsuyama, T., Matsushita, M. 1998. Experimental investigation on the formation of dense-branching-morphology-like colonies in bacteria. *J Phys Soc Japan* **67**, 3630-3636.

- [11] Nakayama, M., Tasaki, S., Shoji, W. 2016. Environmental pH dependence of dense branching morphology-like colonies of *Bacillus subtilis*. *RIMS Kokyuroku* **1994**, 22-27.
- [12] Cosby, W. M., Zuber, P. 1997. Regulation of *Bacillus subtilis* σ^H (Spo0H) and AbrB in response to changes in external pH. *J Bacteriol* **179**, 6778-6787.
- [13] Wilks, J. C. *et al.* 2009. Acid and base stress and transcriptomic responses in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 981-990.