微視的観察に基づくバクテリア秩序形成機構の研究

物理学専攻　本田良二郎

Studies on Ordering Mechanisms of Bacterial Cells on the basis of Microscopic Observations

Department of Physics, Ryojiro Honda

１．研究背景

自然界には様々なパターンが存在する．その中には，全く異なる環境下にありながらもよく似たパターンが出現する場合がある．物理学の観点からは，そのような現象の背後には，パターン形成の普遍的なメカニズムの存在が期待される．物理学ではこれまで，金属葉（電析）や誘電破壊，樹枝状結晶成長，ヴィスカスフィンガリング，しのぶ石，癌細胞や濡れた界面の成長など，様々なパターンに着目した研究がなされてきた．その結果，パターンの能動的な成長が十分遅く，拡散に支配されるような系では DLA（Diffusion Limited Aggregation，拡散律速凝集）状のパターンが生まれ，パターンの成長界面が揺らぎを伴いながら進行する系では Eden パターンに似た声質を持つ構造が生じることがわかった．無生物系で観察されるパターンの研究により，パターンの振る舞いや成長メカニズムを系の詳細に依らない普遍的な視点から捉えることが可能となった．さらに驚くべきことに，バクテリア・コロニーのような生物系においても，環境条件を適切に設定することにより，無生物系と同様のパターンが発現することが知られるようになった．バクテリアコロニーは，バクテリアの運動性や増殖率といったバクテリアの生物的特性を抑えるような生存に厳しい環境条件を課せば，能動的に成長できず無生物系のパターンと共通の振る舞いを示す．逆に，成長しやすい環境条件を整えれば，生物系特有の動的なパターンが発現する．この動的なパターンの振る舞いを特徴づけることが本研究の目的である．

本研究では，２つのテーマを扱った．１つ目のテーマは，Eden パターンの環境条件の下でのバクテリア・コロニーの初期成長過程において観察されるバクテリア紐状成長である．Eden パターンの成長界面を微視的に観察すると，紐状に伸びた菌が存在する様子が確認できる．この環境条件の下，稀薄菌液を用いることにより，菌単体の状態から成長する様子を観察すると，菌細胞が細胞分裂後に完全に分離せずに一本の紐のように連なり，伸長と折り畳みを繰り返して空間的な広がりを獲得する様子が確認できた．この時間発展を特徴づけるために，フラクタル次元と微分方程式系を導入してアプローチした．２つ目のテーマは，円形プール内におけるバクテリア集団運動である．寒天培地平面上に作成した円形の窪み（プール）にバクテリアをトラップし，その内部で動き回る菌集団の秩序状態を特徴付けることを試みた．この実験系では，プール内部の菌密度と，プール直径に対する菌の平均の長さとして定義される換算菌体長という２つの量が菌集団の運動状態を決めるコントロールパラメーターとなっている．コロニーの成長界面が進行と停止を繰り返す同心円状パターンを用いることにより，菌体長をコントロールした．本研究では，密度が低い領域で，換算菌体長を変化させることによって観察される *random motion* phase と *one-way rotational motion* phase という２つの相の振る舞いに焦点を当てた．その振る舞いは，換算菌体長を増大させることにより，ランダムな振る舞いからプールの縁に沿った反時計回りの運動へと変化する．この秩序状態の変化を特徴づけるために秩序変数を導入してアプローチした．さらに，秩序状態の変化を引き起こす要因を明らかにするために，菌単体の系の振る舞いを詳細に調べて比較した．

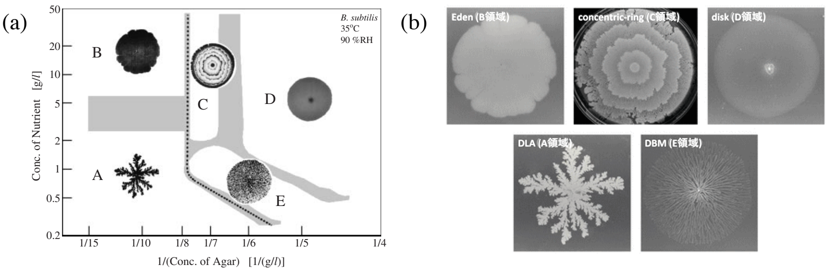

図１．*Bacillus subtilis* のバクテリア・コロニー．(a) 横軸を寒天濃度 C_{a} の逆数，縦軸を栄養濃度 C_{n} としたときのコロニーのパターンの相図．(b) ５種類のコロニーのパターンのスナップショット．

2. バクテリア紐状成長の研究

研究の目的

寒天の硬さが固く栄養が豊富な（バクテリア・コロニーの Eden パターンの）環境条件の下，希薄菌液を用いて局所的に菌単体の状態からの成長を観察する．この環境条件において観察されるバクテリアの紐状成長は，紐の各点各点で菌が成長するために互いに押しのけ合うことにより複雑な折り畳み構造を形成するパターンである．本研究では，そのような折り畳みを伴う動的なパターンを特徴づけることを目的とした．

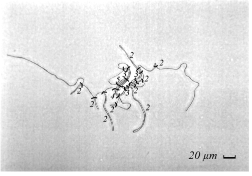

図２. *B. subtilis* の紐状成長のスナップショット．k（$k = 1, 2, 3, \ldots$）と数字が添えられている部分は k 重に折り畳まれていることを示す．

研究の方法

(i) 菌単体から紐状に成長する様子を観察し，ボックスカウント法を用いて成長するパターンのフラクタル次元の時間発展を定量化した．

(ii) 成長するパターンを折り畳まれた回数に分類して長さを計測し，折り畳み部分の長さの遷移を次の非線形微分方程式系により記述することを試みた．

$$\frac{d}{dt} l_1(t) = \alpha(1-\beta) l_1(t) - \delta_1 l_1(t) l_2(t),$$

$$\frac{d}{dt} l_2(t) = \alpha(1-\gamma) l_2(t) + \alpha\beta l_1(t) - \delta_2 l_1(t) l_2(t),$$

$$\frac{d}{dt} l_{3+}(t) = \alpha l_{3+}(t) + \alpha\gamma l_2(t) + (\delta_1 + \delta_2) l_1(t) l_2(t), \quad t \geq t_*.$$

ここで，l_1，l_2，l_{3+} はそれぞれ，紐の１重，２重，３重以上の長さを表し，αは紐の成長率，βは１重から２重への遷移率，γは２重から３重以上への遷移率を表す．δ_1，δ_2 は l_1と l_2 のカップリングの影響を考慮する量である．

研究成果

(i) 図３(a)に示すように，寒天培地上に菌液を接種してから一定時間ごとにフラクタル次元を計測すると，フラクタル次元の時間発展がシグモイド関数的に増大する様子が確認できた．

(ii) 菌が成長を開始した後に，紐が k 重に折り畳まれた部分毎に長さを計測し，上記非線形微分方程式系の摂動展開により得られた近似解を用いてフィッティングを行うと，図３(b)のように計測結果をよく再現できた．他方，非線形項を考慮しない場合は解析解は求まるが，実験結果をうまく再現できなかった（図３(c)）．

観察では，(i)のフラクタル次元が急激に増大を始める時刻において，それまで１次元的な紐であったパターンから折り畳みを生じて２次元的に広がりを持つパターンへ変化する様子が確認できた．また，図(b)(c)の比較から，非線形項が重要な役割を果たしていると考えられた．この非線形項は，直感的には１重部分と２重部分が併合して３重部分が生成される振る舞いに対応している．ゆえに，高次に折り畳まれた構造が生成されるには，単純に折り畳まれるだけでなく，低次の構造が伸長し衝突して生まれる影響も重要であると考えられる．

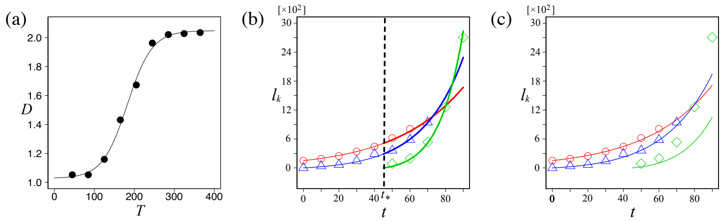

図３.時間発展する紐状成長のパターンの特徴づけ．(a) フラクタル次元 D の時刻 T 依存性.(b)(c) k 重に折り畳まれた部分の長さ l_k の時刻 t 依存性．(b)は非線形項を考慮した場合の結果を表す．

3. バクテリア集団運動の研究

研究の目的

円形プール内におけるバクテリア集団運動の相図（図４）の（a）*random motion* phase と（c）*one-way rotational motion* phase に着目し，換算菌体長 λ の増大に伴う秩序状態の変化を定量的に特徴づけることを目的とした．その上で，秩序状態の変化をもたらすと考えられる要因（cell–cell interaction，菌とプールの壁との相互作用，運動方向の揺らぎ）のうちの何が集団の運動状態の変化に本質的な役割を果たすかを明らかにすることを目指した．

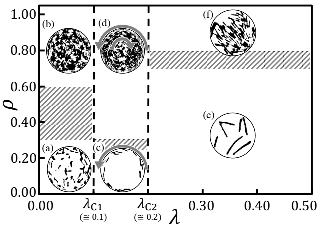

図４．円形プール内における *B. subtilis* の集団運動の相図．(a) *random motion* phase, (b) *turbulent motion* phase, (c) *one-way rotational motion* phase, (d) *two-way rotational motion* phase, (e) *random oscillatory motion* phase, (f) *ordered oscillatory motion* phase. (c)と(d)の相の矢印は運動の回転方向を表す．$\lambda_{\mathrm{C1}} \cong 0.1, \lambda_{\mathrm{C2}} \cong 0.2$ にある２つの点線で示された相の境界において，集団運動の様子

研究の方法

(i) 菌集団の系の実験観察と速度場の計測を行い(図５(a), (b))，プールの周方向の運動成分の強さとして秩序変数 Q を導入し，λ 依存性を調べた．

(ii) 菌単体の系の観察と菌細胞の追跡を行い，(i)の Q に相当する量 $\tilde{Q}$ を定義して λ 依存性を調べた．

(iii) 菌単体の系の速さ分布を解析し，菌細胞の平均速度 v_{ave} と $\tilde{Q}$ の関係を調べた．

研究結果

(i) 図５(c)に示したように，Q が $\lambda = \lambda_{\mathrm{C1}}$ で転移する様子を確認した．

(ii) (i)と異なり，$\tilde{Q}$ に λ 依存性は見られず，転移は確認できなかった．

(iii) $\tilde{Q}$ は v_{ave} に依存することがわかった．また，菌単体の系の速さ分布は２つのピークを持ち，v_{ave} の値が小さいほど菌細胞の軌跡は複雑になる傾向があった．

(i), (ii)の結果より，この系の菌集団の秩序状態の転移においては cell–cell interaction が本質的であると考えられる．加えて，(ii)で $\tilde{Q}$ は常に正であったため，菌細胞はプールの縁に沿って反時計回りに運動する性質を備えていることが示唆された．菌細胞の運動を詳しく観察すると，時計回りと反時計回りで運動する様子が異なることから，壁との相互作用には何らかの生物学的な要因が影響すると考えられた．そこで，このプールの縁と菌細胞の相互作用を cell–boundary interaction と定義した．また，(ii), (iii)の結果を踏まえて菌細胞の速度を詳細に調べると，菌単体の系の平均速度 v_{ave} は速さ分布の２つのピークの大小関係でほぼ決まると考えられることがわかった．その２つのピークは方向転換する頻度（運動方向の揺らぎの影響）と菌の特徴的な速さを表し，観察結果と合わせると，運動方向の揺らぎは培地表面上の凹凸により引き起こされていると思われた．ゆえに，そのような環境に内在するノイズとの相互作用を cell–noise interaction とみなし，この相互作用の影響により方向転換が生じると考えられる結果を示した．以上より，本研究は円形プール内におけるバクテリア集団運動の系の $\lambda = \lambda_{\mathrm{C1}}$ における秩序状態の転移を定量的に特徴づけることに成功し，さらにこの系に働く主要な相互作用（cell–cell interaction, cell–boundary interaction, cell–noise interaction）を説明した上で，秩序状態の転移が cell–cell interaction の影響により引き起こされると考えられることを実験的に示した[4]．

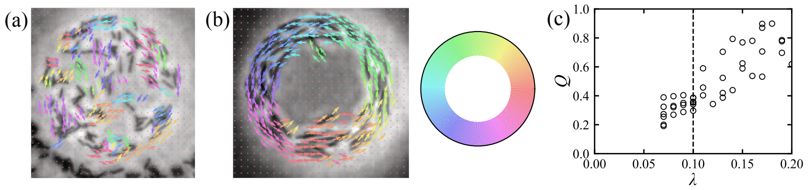

図５．集団運動の様子と秩序状態の転移. (a), (b) はそれぞれ *random motion* phase と *one-way rotational motion* phase のバクテリア集団運動の様子. (c)は Q の λ 依存性を表す．$\lambda = \lambda_{\mathrm{C1}}$ で転移する様子が確認できる．

４．課題・展望

紐状成長の研究では，菌が成長を開始してから数時間程度のごく初期の段階におけるパターンに着目した．これは，培地への菌液接種後数時間の間に観察される数 10 μm 程度の微視的な紐状構造のパターンである．他方,バクテリアコロニーは数 cm 規模の巨視的な構造物であり，観察には数日から１週間程度を要する．紐状成長は，培養を続ければやがてはコロニーになるはずであるから，今回調べた初期のパターン以後も観察することにより，折り畳まれた紐状構造がどの段階で Eden コロニーと共通の性質を獲得するようになるかを調べることは興味深い課題である．特に，Eden コロニーの成長界面についてはよく調べられており，自己アフィン・フラクタル性を持つことが示されている．ゆえに，紐状成長が折り畳みを伴って２次元的な広がりを持つ成長へ遷移した後，そこから更に自己アフィン・フラクタル性を有する成長界面へと変化する様子を確認することは重要である．

バクテリア集団運動の研究では，換算菌体長 λ を変化させることにより菌集団の系の秩序状態の変化を調べた．直感的には, λ は菌が平均的にプールに対してどれだけ大きいかを表す量であり，その菌の大きさというのは菌同士の相互作用のしやすさに直結している．SPP model では，相互作用のしやすさというのは密度が一定であれば相互作用半径の大きさと対応づいている．したがって１つの解釈として，この実験系で観察された転移は，相互作用半径の変化によりもたらされたものであると理解することができる．しかしながら, SPP model でこれまでよく研究されてきたのは，密度（あるいはノイズ振幅）の変化に伴う秩序状態の転移である．他方，本実験系では，λ の増大という相互作用半径の変化による転移ではしきい値 $\lambda_{C1} (\cong 0.1)$ の存在を確認できたが，菌密度の増大に伴う秩序状態の変化ではしきい値の存在を確認できなかった（補足資料）．他の実験系においても同様の結果になるのかについて，今後より注意深く調べていくことが重要である．また，確認されたしきい値 $\lambda_{C1} \cong 0.1$ という値が自己推進するバクテリアを用いた動的な系の結果としてもたらされたものであるかを明らかにする必要がある．これを調べるためには，棒状粒子を用いた静的な系で実験することが有効であると考える．また，今回研究対象としたのは図４の相図の（a）*random motion* phase と（c）*one-way rotational motion* phase の間の λ_{C1} に関する転移だけであるため，今後 λ_{C2} における秩序状態の変化についても調べる必要があると考える．

参考文献

[1] M. Matsushita, F. Hiramatsu, N. Kobayashi, T. Ozawa, Y. Yamazaki, and T. Matsuyama, Biofilms **1**, 305 (2004).
[2] R. Honda, J. Wakita, and M. Katori, J. Phys. Soc. Jpn. **84**, 114002 (2015).
[3] J. Wakita, H. Itoh, T. Matsuyama, and M. Matsushita, J. Phys. Soc. Jpn. **66**, 67 (1997).
[4] J. Wakita, S. Tsukamoto, K. Yamamoto, M. Katori, and Y. Yamada, J. Phys. Soc. Jpn. **84**, 124001 (2015).
[5] R. Honda, S. Umeda, and J. Wakita, J. Phys. Soc. Jpn. **88**, 054005, (2019).