

寒天培地上で成長する枯草菌コロニーは、培地の寒天濃度 C_a と栄養濃度 C_n の2つのパラメータによって5種類のパターンに分類できる (図1)。本研究では、 C_a が低く (培地が柔らかい)、かつ C_n が低い条件下で、コロニーの枝先端部が分岐を繰り返しながら等方的に成長するDBMパターンに着目した。枯草菌は寒天培地上でコロニー形成時にサーファクタント (界面活性剤) を分泌するが、先行研究よりこのサーファクタントはコロニーが拡がりやすくなるように作用していることが確認されている。また先行研究により、サーファクタントを分泌しない変異株では、サーファクタントをあらかじめ培地表面に添加することで、コロニーが時計回りの螺旋成長を示すことが分かっている。

研究目的

枯草菌が増殖時に分泌するサーファクチン (枯草菌が分泌するサーファクタント) をあらかじめ寒天培地表面に添加したときのコロニー成長については、サーファクタントを分泌しない変異株に関して調べられているのみで、野生株に関する報告はまだない。変異株の実験では、コロニーがDBMパターンを示す培地条件下において、高濃度のサーファクチンをあらかじめ培地表面に添加しておくことでDBMパターンが時計回りの螺旋成長を示すことが確認されていることから、本研究では、DBMパターンの培地条件のもと、培地表面にあらかじめ高濃度のサーファクチンを添加しておいたときに、野生株の形成するDBMパターンが

1. 変異株と同じように時計回りの螺旋成長を示すか?
- もしも螺旋成長を示す場合には、そのメカニズムを明らかにするために、
2. コロニーのマクロな様子の観察
3. 光学顕微鏡観察によるコロニー枝先端部の微視的観察
4. 菌の配列の違いの定量化

を行うことを目的とする。

マクロな観察結果

本研究では、

- (I) $C_a=6.0\text{g/L}, C_n=0.4\text{g/L}$
- (II) $C_a=5.0\text{g/L}, C_n=0.4\text{g/L}$
- (III) $C_a=6.0\text{g/L}, C_n=0.5\text{g/L}$

の3つの環境条件に絞り、サーファクチンを添加した培地と添加していない培地の実験を行った。(I)の培地条件を基準とし、 C_n を一定にして、 C_a を変化させたのが(II)の培地条件、 C_a を一定にして、 C_n を変化させたのが(III)

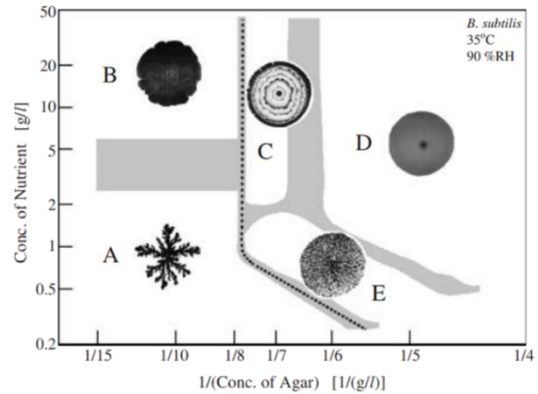


図1 枯草菌のモルフォロジー・ダイアグラム[1]。

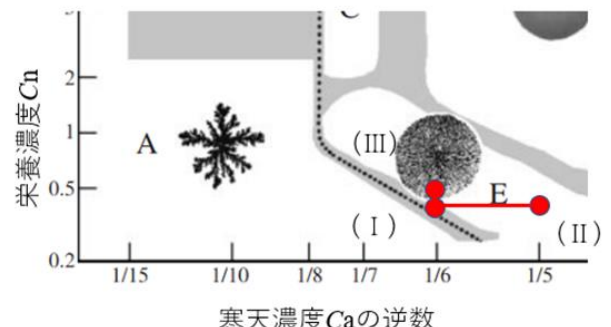


図2 実験を行った3つ環境条件におけるモルフォロジー・ダイアグラムの位置関係。

の培地条件である。

(I) $C_a=6.0\text{g/L}$, $C_n=0.4\text{g/L}$ では、サーファクチンを添加することで、コロニーが時計周りの螺旋成長を示すことが確認された。この螺旋成長においても DBM パターンの特徴である成長先端部が円に揃っていることが確認できる。また、サーファクチンを添加することで、枝幅および枝間隔が狭くなり、枝の分裂頻度が減少することも確認できる。

(II) $C_a=5.0\text{g/L}$, $C_n=0.4\text{g/L}$ では、(I)と同様に、サーファクチンを添加した培地では螺旋成長がみられ、添加していない培地と比較すると、サーファクチンを添加した培地において枝幅および枝間隔が狭くなっていることが確認できる。また、枝の分裂頻度が減少しているように見える。

サーファクチンを添加した場合と添加していない場合について(I)と比較すると、どちらにおいても寒天濃度 C_a が低い方が(培地が柔らかい方が)枝幅および枝間隔が狭くなっているように見える。枝の分裂頻度は増加しているように見える。

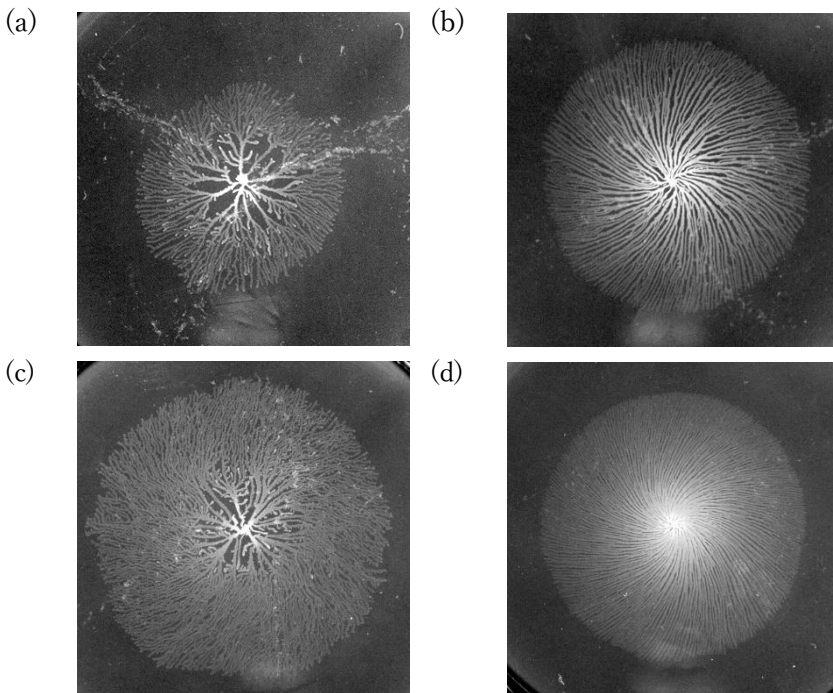
(III) $C_a=6.0\text{g/L}$, $C_n=0.5\text{g/L}$ では、(I),(II)と同様に、サーファクチンを添加した培地では螺旋成長がみられ、添加していない培地と比較すると、枝幅および枝間隔が狭くなり、枝の分裂頻度が減少することが確認された。

さらに、サーファクチンを添加した場合と添加していない場合について(I)と比較すると、どちらにおいても栄養濃度 C_n が高い方が枝幅および枝間隔が狭くなっているように見える。枝の分裂頻度は増加しているように見える。これは先行研究の結果と一致している。

DBM の特徴である

- ① 栄養濃度 C_n が高いほど枝幅が細くなる
- ② 栄養濃度 C_n が高いほど枝間隔が狭くなる
- ③ 栄養濃度 C_n が高いほど枝の分裂頻度が増加する

に関しては、サーファクチンを添加した場合でも成り立っていることが分かる。



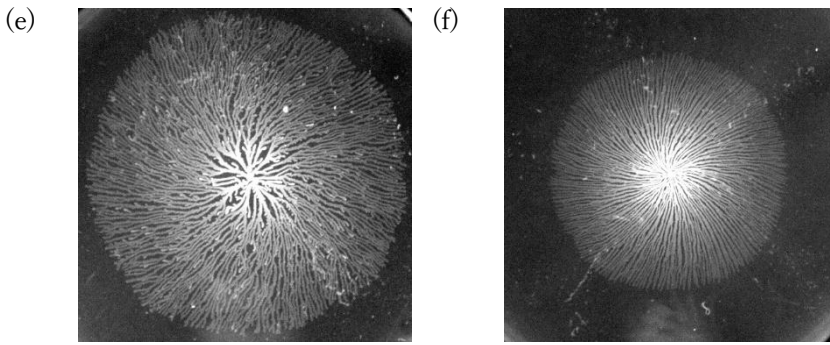


図 3 コロニー・パターンの様子。(a)サーファクチン添加無し ($C_a=6.0\text{g/L}$, $C_n=0.4\text{g/L}$)、(b)サーファクチン添加有り ($C_a=6.0\text{g/L}$, $C_n=0.4\text{g/L}$)、(c)サーファクチン添加無し ($C_a=5.0\text{g/L}$, $C_n=0.4\text{g/L}$)、(d)サーファクチン添加有り ($C_a=5.0\text{g/L}$, $C_n=0.4\text{g/L}$)、(e)サーファクチン添加無し ($C_a=6.0\text{g/L}$, $C_n=0.5\text{g/L}$)、(f)サーファクチン添加有り ($C_a=6.0\text{g/L}$, $C_n=0.5\text{g/L}$)。

光学顕微鏡を用いた観察

(II) $C_a=5.0\text{g/L}$, $C_n=0.4\text{g/L}$ の条件で顕微鏡観察を行ったところ、サーファクチンを添加しない場合では、コロニー最外周枝先端部の菌密度は高く、菌が密集した状態で活発に動き回っている様子が観察された。枝先端部の成長界面に着目すると、界面に対して棒状の菌が平行に並ぶことで壁が形成される傾向がみられた。成長界面より内部の菌の動きは局所的に揃ってはいるが、その大きさは数匹程度であり、全体としてはランダムであるようにみられる。活発に運動している菌集団が、界面に並んで壁を形成している菌を内から外へ押し出すことにより界面が進行しているようにみられ、界面で壁を形成している菌自体が界面の進行を駆動しているようにはみられない (図 4(a))。

サーファクチンを添加した場合は、サーファクチンを添加していない時に比べて、コロニー内部の菌密度は低いが、菌の運動性は活発である様子が観察された。コロニー最外周枝先端部の成長界面に着目すると、界面に対して棒状の菌が斜めに並ぶ傾向がみられ、それらの菌は図中に示した矢印の方向へ進行する様子が観察された。結果として、枝先端部は時計周りの方向へ成長していた。コロニー内部の菌の動きは、サーファクチンを添加していない場合と同様に数匹の大きさで局所的には揃っているが、全体としてはランダムであるようにみえる。主に、成長界面に配列した菌集団の運動が成長界面の進行を駆動している様子が観察された (図 4(b))。

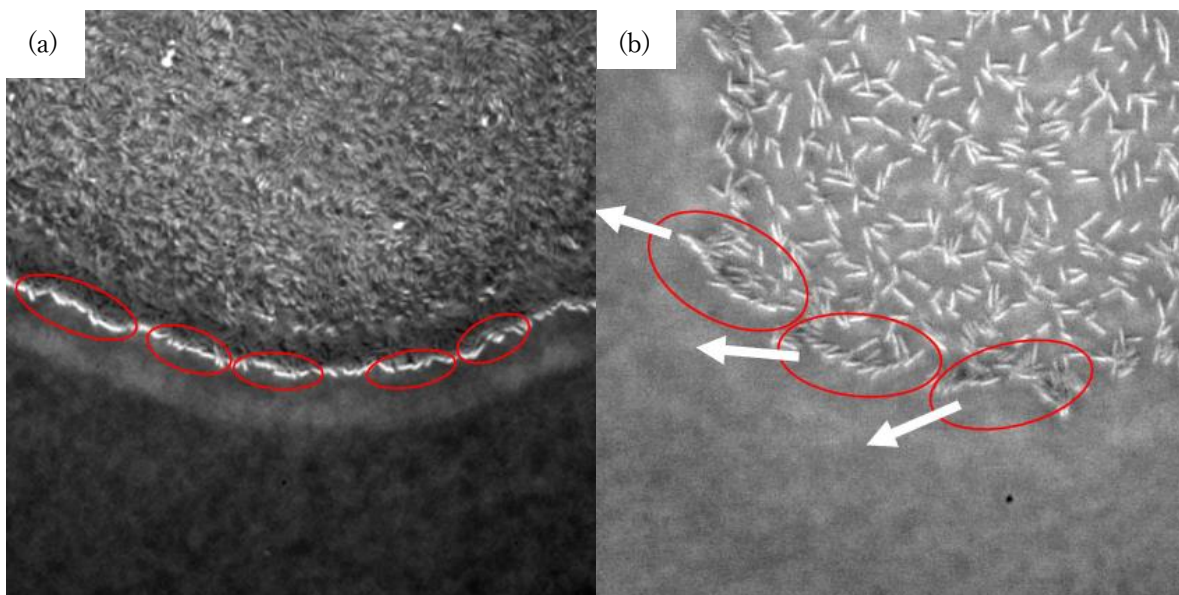


図 4 (a)サーファクチンを添加した培地上での枯草菌コロニーの顕微鏡観察の様子。(b) サーファクチンを添加していない培地上での枯草菌コロニーの顕微鏡観察の様子。 $C_a=5.0\text{g/L}$, $C_n=0.4\text{g/L}$ 。画像の横幅は約 0.4mm。

コロニー界面における菌の配列の定量化

成長界面に溜まる菌の配列の定量化を行った。顕微鏡観察動画からある静止画を任意に3枚取り出し、それぞれの静止画に写っている枝先端部の成長界面に対して真円でフィッティングを行った。そして、成長界面に対して斜めに配列する菌が円の接線となす角度 θ を求めた。この角度 θ は反時計回りの方向を正として、 $0^\circ \leq \theta < 180^\circ$ の範囲で定義した(図5)。 $C_a=5.0\text{g/L}$, $C_n=0.4\text{g/L}$ の条件において3枚の静止画に対して行い、角度 θ の分布をヒストグラムで表した(図6)。

ヒストグラムを見ると、サーファクチンを添加していない培地上では、ピークが 0° より少し大きい 30° のところと 180° よりも少し小さい 160° の付近にあり、 90° 付近の数は少ないことが確認できる。角度分布の平均値を求めたところ、約 88° となり、このヒストグラムは 90° を中心に対称性を持っているように見える。一方で、サーファクチンを添加した培地上では、分布のピーク位置は 30° 付近のみに存在し、サーファクチンを添加しない場合にみられた 160° 付近にはピークはみられなかった。また、角度分布の平均値を求めたところ、約 55° となり、これは菌が界面に対して斜めに並ぶ傾向があることを表している。

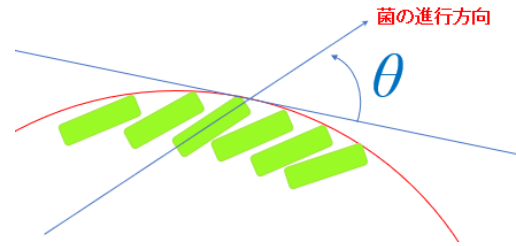


図5 コロニー界面に対する菌体のなす角度の定義。反時計回りに $0^\circ \leq \theta < 180^\circ$ の範囲。赤線が界面をフィッティングした円、緑色の長方形が菌を表している。

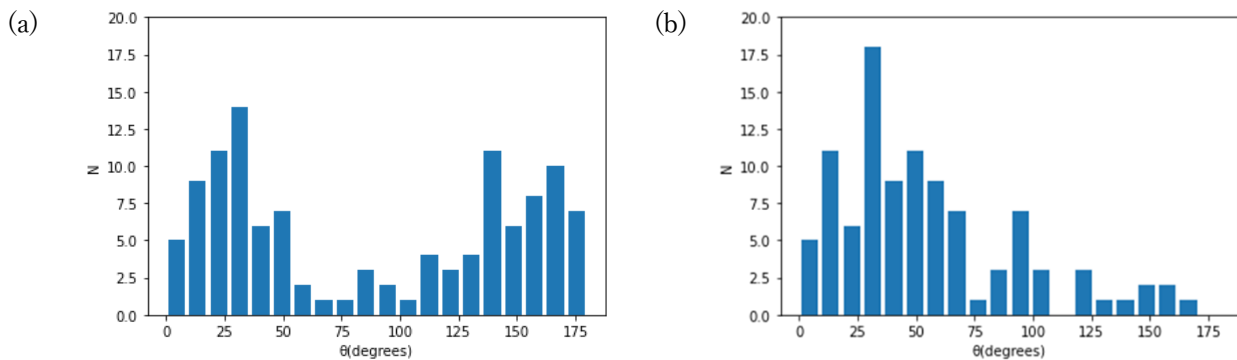


図6 成長界面に対する菌体のなす角度のヒストグラム ($0^\circ \leq \theta < 180^\circ$)。 (a)サーファクチン添加無し、(b)サーファクチン添加有り。 $C_a=5.0\text{g/L}$, $C_n=0.4\text{g/L}$ 。

まとめと考察

枯草菌野生株はサーファクタントを分泌しない変異株と同様に DBM パターンの培地条件下において、高濃度のサーファクチンをあらかじめ培地表面に添加することで、時計回りの螺旋成長をすることが確認された。微視的観察を行ったところ、サーファクチンを添加した場合には、コロニー最外周枝先端部では菌がランダムに動いているが、枝先端部の成長界面では棒状の菌が界面に対して斜めに並ぶ様子が観察された。一方で、サーファクチンを添加していない培地では、コロニー内部で菌がランダムに動くことは変わらないが、枝先端部の成長界面では菌が界面に対して平行に並ぶ傾向がみられた。この配列の様子を定量化するために、成長界面における菌体の界面に対してなす角度の分布を作成した。その結果、サーファクチンを添加した場合には 30° 付近のみにピークを持つ裾が伸びた分布が得られたのに対して、サーファクチンを添加していない場合には 30° と 160° 付近の2カ所にピーク位置がみられ、 90° 付近を中心に対称的な分布が得られた。このことから、成長界面の菌の配列の違いがコロニーの成長パターンの違いを引き起こしていることが考えられる。サーファクチンを添加した場合には、コロニー成長界面の菌が斜めに配列しており、それらの菌が界面の進行を駆動し、コロニー全体として時計回りの回転性を引き起こしていると考えられる。

参考文献 [1]M. Matsushita, F. Hiramatsu, N. Kobayashi, T. Ozawa, Y. Yamazaki, and T. Matsuyama, *Biofilms* 1, 305 (2004).