

第1章 研究背景

枯草菌 *Bacillus (B.) subtilis* (野生株 OG-01 株)は寒天培地上で菌の運動と増殖により成長する。菌の運動をコントロールする量として寒天培地の寒天濃度 C_a を、菌の増殖をコントロールする量として栄養濃度 C_n をパラメータとする。これら 2 つの値の組み合わせに応じて観察される様々な形のコロニー・パターンを C_a の逆数を横軸、 C_n を縦軸として分類したものをモルフォロジー・ダイアグラム(図 1)という。本研究では C_a が低く(寒天培地が柔らかい)、 C_n が低い(栄養が少ない)条件でみられる DBM(dense-branching morphology)パターン(図 2)に着目した。枯草菌コロニーの DBM パターンの特徴として、密集した枝構造を取るにもかかわらず、コロニー最外周の枝先端部をつないだ曲線が円形であるという事が挙げられる。ある分岐点から次の分岐点までの枝長 l の分布は、指数分布に従う。 C_n が大きくなるとコロニー成長速度が速くなり、枝の分岐頻度が高くなる頃も確認されている。光学顕微鏡を用いた微視的観察においては枝の分岐は培地表面の凹凸ノイズにより引き起こされていることが確認されている。このことから、枝の分岐はランダムに起こっていることがわかる。また、枯草菌はコロニー形成時にサーファクチンを分泌し、サーファクチンがコロニー成長時に広がりやすくするように働いていることも確認されている。

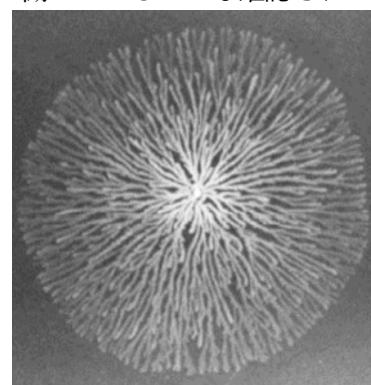
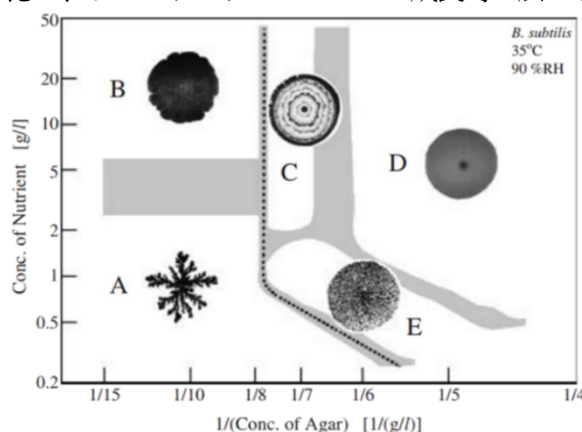


図1. *B. subtilis* のモルフォロジー・ダイアグラム。横軸は寒天培地の固さを表す寒天濃度 C_a の逆数、縦軸は寒天培地の栄養量を表す栄養濃度 C_n を示している。領域AはDLAパターン、領域BはEdenパターン、領域Cは同心円状パターン、領域Dはdisk状パターン、領域EはDBMパターン[1]。

図2. *B. subtilis* コロニーのDBMパターン。 $C_a=5.0$ g/L, $C_n=0.5$ g/Lで約1日間培養した後に得られたコロニー・パターン。コロニーの大きさは5 cm程度[2]

第2章 研究目的

本研究では、枯草菌 DBM コロニーの成長に対してサーファクチン濃度の違いが与える影響を明らかにすることを目的とした。具体的には、サーファクチン濃度 C_x をパラメータとしたときの

1. 枝分かれ頻度 b (コロニー枝先端部の成長界面が培地の凹凸ノイズから受ける影響)
 2. コロニーの成長速度 v (コロニー成長界面の広がりやすさ)
- を定量的に調べた。

第3章 実験方法

サーファクチンの作成

1. サーファクチンの粉末 10 mg をエタノール 5 mL に溶かしたものを作成し、これを基準 C_0 (=2 g/L) とする。
2. C_0 をエタノールで 5 倍(C_5)、20 倍(C_{20})、40 倍(C_{40})、60 倍(C_{60})、80 倍(C_{80})に希釈したものを用意する。

サーファクチンを添加した寒天培地の作成

1. 寒天濃度と栄養濃度をパラメータとし、pH7.1 に調節した寒天培地を作成する。
2. サーファクチン 80 μ L を寒天培地表面中心に垂らし、乾燥器に 90 分間培地を入れて培地表面を乾燥させる。
3. 完成した寒天培地中心の表面に枯草菌を点接種し、恒温恒湿器に培地を入れて 1~2 日間培養する。

枝分かれの頻度の測定方法

1. コロニーを写真撮影し、1 px の線を引く。その後、二値化処理を行い、枝長 l の測定を行う。
2. 枝長 l の累積分布を作成し、横軸を枝長 l [mm]、縦軸を累積数 N の対数として、枝長分布を作成する。
3. 作成した分布に対して $N = ae^{-bl}$ (a, b は任意定数)の関数でフィッティングする。
4. 横軸をサーファクチン濃度 C_x 、縦軸を指数 b としたグラフを作成する。

成長速度の測定方法

1. コロニーを培養する際、1 時間に 1 回のインターバル撮影を行う。
2. 菌の接種点から枝先端までの距離(4 方向)を測定し平均値 \bar{r} を求める。
3. 横軸を時間 t [h]、縦軸を \bar{r} [mm]としてグラフを作成する。このグラフの傾きから成長速度 v を求める。

第4章 実験結果

寒天培地にさまざまな濃度のサーファクチンを添加した際の、コロニーの枝長 l と累積数 N の関係を示した枝長分布が図3である。この結果から、先行研究と同様に枝長分布が指数関数に従っていることが分かる。ここでグラフの傾き b は枝分かれの頻度を表し、傾き b が大きいほど枝分かれの頻度が高いことを意味している。この枝長分布をみると、添加するサーファクチン濃度 C_x が高濃度になるほどグラフの傾き b は小さくなっている。つまり、枝分かれの頻度 b が低くなっていることが分かる。

図4はサーファクチン濃度 C_x と指数 b (グラフの傾き)の関係を示したものである。このグラフから $0.030 \text{ g/L}(C_{60}) \leq C_x \leq 0.40 \text{ g/L}(C_5)$ において、指数 b は C_x に対して負の相関があることがわかる。つまり、サーファクチン濃度 C_x が高濃度になると枝分かれの頻度が低くなることを示している。また、サーファクチン濃度が $C_x = 0.40 \text{ g/L}(C_5)$ で枝分かれの頻度は最小値を取り、 $C_x \geq 0.40 \text{ g/L}(C_5)$ で b は C_x に対して正の相関に転じる。 $C_x \geq 0.40 \text{ g/L}(C_5)$ の振る舞いは先行研究から予想される結果である。 $C_x = 0.030 \text{ g/L}(C_{60})$ 以下では枝分かれの頻度は頭打ちになっている。

そして、図5はサーファクチン濃度 C_x と成長速度 v の関係を示したものである。サーファクチン濃度が $C_x \geq 0.030 \text{ g/L}(C_{60})$ において成長速度 v は C_x に対し正の相関があることがわかる。 $C_x \leq 0.030 \text{ g/L}(C_{60})$ では v に変化がみられない。 $C_x = 0.025 \text{ g/L}(C_{80})$ は、先行研究から予想される野生株が分泌するサーファクチン濃度 $C_x = 0.030 \text{ g/L}(C_{60})$ よりも低濃度であり、そのため v に変化がみられないと考えられる。

$0.030 \text{ g/L}(C_{60}) \leq C_x \leq 0.40 \text{ g/L}(C_5)$ における指数 b の C_x に対する振る舞いは、先行研究から予想される振る舞いとは異なるものであり、サーファクチンが凹凸ノイズによる枝の分岐を弱める働きをしていることがわかる。

C_x と v の関係からは、サーファクチン濃度が $C_x = 0.030 \text{ g/L}(C_{60})$ より高濃度になると v は上昇し、 $C_x \leq 0.030 \text{ g/L}(C_{60})$ では変化がみられなかった。サーファクチン濃度 $C_x = 0.025 \text{ g/L}(C_{80})$ は、先行研究から判明している野生株が分泌するサーファクチン濃度に相当する $C_x = 0.030 \text{ g/L}(C_{60})$ よりも低濃度であるため、 v に変化が

みられないと考えられる。 $C_x \geq 0.030 \text{ g/L}(C_{60})$ において v が C_x に対して比例して速くなるという結果から、横軸の C_x は v で置き換えて考えることができる。

以上の結果より、実験で得られた指数 b の C_x に対する振る舞いは図6に示すような $b=f(C_x)$ で表される減少関数と、 $b=g(v(C_x))$ で表される増加関数の重ね合わせとなっている可能性が考察される。

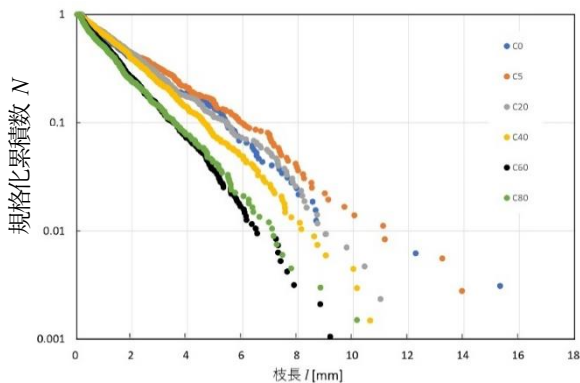


図3. サーフアクチン添加時の枝長 l と累積数 N の関係

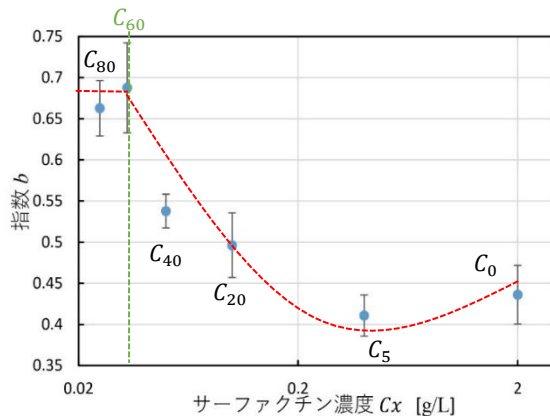


図4. サーフアクチン濃度 C_x と指数 b の関係

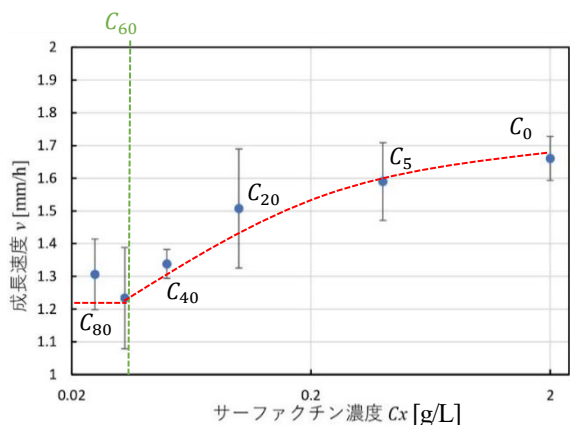


図5. サーフアクチン濃度 C_x と成長速度 v の関係

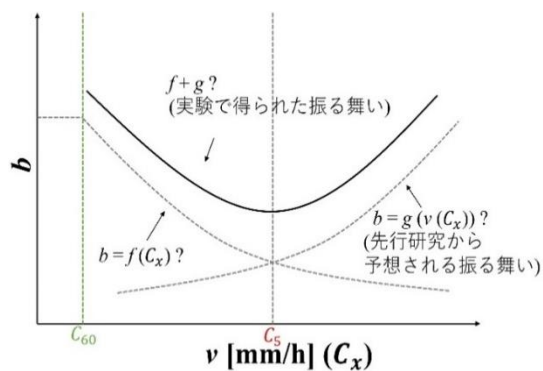


図6. 実験結果から考えられる振る舞い

第5章 考察

サーファクチン濃度 C_x を変えるとコロニーの成長速度 v と培地の凹凸ノイズが枝の分岐頻度 b に与える影響の両方が変化してしまう。そこで、指数 b の振る舞いが図6に示したような $b=f(C_x)$ と $b=g(v(C_x))$ の重ね合わせとなっていることを確認するために、サーファクチン濃度 C_x を固定して他のパラメータを変えることにより、コロニー成長速度 v と培地の凹凸ノイズの強さを個別にコントロールしたいと考えた。具体的な方法として、第4章の結果で述べた指数 b の値が最小値を取るときのサーファクチン濃度 $C_x = 0.40 \text{ g/L}(C_5)$ に固定した上で、栄養濃度 C_n と寒天濃度 C_a をパラメータとしたときの成長速度 v 及び指数 b の振る舞いを調べる検証実験を行った。その際、 $C_a=6.0 \text{ g/L}$ 、 $C_n=0.40 \text{ g/L}$ を基準とした。

サーファクチン濃度を $C_x = 0.40 \text{ g/L}(C_5)$ 、栄養濃度を $C_n=0.40 \text{ g/L}$ に固定し、寒天濃度 $C_a(=5.0 \text{ g/L}, 5.5 \text{ g/L}, 6.0 \text{ g/L}, 6.5 \text{ g/L})$ の各場合についてコロニー成長速度 v の振る舞いを示したものが図7である。 v は C_a によらず一定になるということがわかる。つまり、 C_n を固定することで v を一定にすることができたと考えられる。また、寒天濃度 C_a と指数 b の振る舞いを示したものが図8である。 C_a と b の間には負の相関があることがわかる。つまり、 C_a が高濃度になると枝分かれの頻度が低くなる、培地の表面凹凸ノイズが枝の分岐に与える影響が弱まっていることがわかる。

サーファクチン濃度 $C_x = 0.40 \text{ g/L}(C_5)$ と $C_a=6.0 \text{ g/L}$ に固定し、栄養濃度 $C_n(=0.30 \text{ g/L}, 0.35 \text{ g/L}, 0.40 \text{ g/L}, 0.45 \text{ g/L}, 0.50 \text{ g/L})$ の各場合についてコロニー成長速度 v の振る舞いを示したものが図9である。栄養濃度 C_n と成長速度 v の間には正の相関があることがわかる。つまり、 C_n を高濃度にするると v が速くなるということがわかる。また、 C_n と b の振る舞いを示したものが図10である。 C_n と b の間には正の相関があることがわかる。つまり、 C_n を高濃度にするると枝分かれの頻度 b が高くなるということがわかる。さらにこの結果と図9の結果より、 b は v が速くなると大きくなるということがわかる。 v が速くなることによって培地表面の凹凸ノイズが枝分かれの頻度 b を高めていると考えられる。

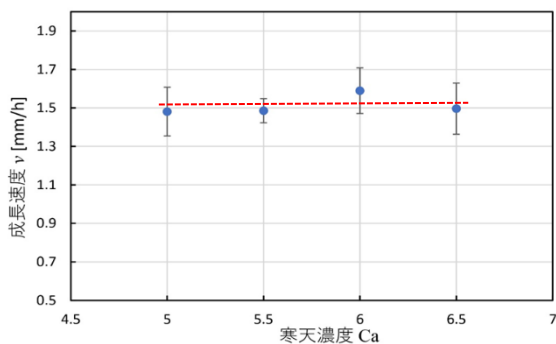


図7. 寒天濃度 C_a と成長速度 v の関係。

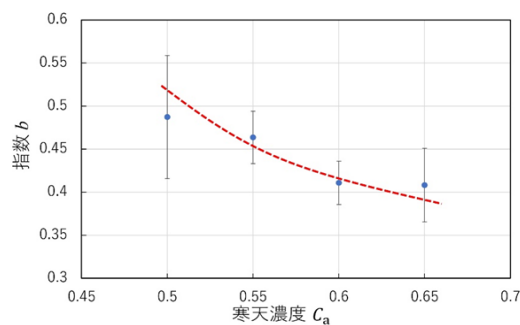


図8. 寒天濃度 C_a と指数 b の関係。

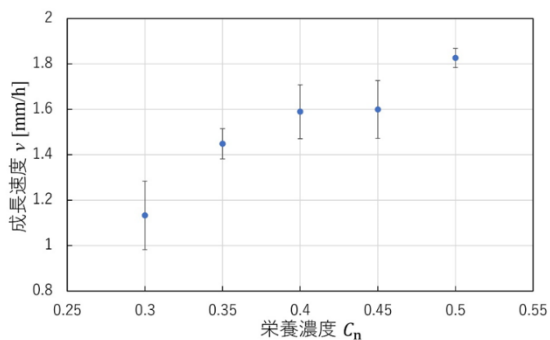


図9. 栄養濃度 C_n と成長速度 v の関係。

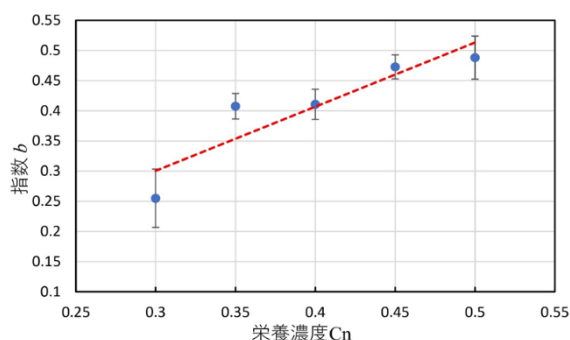


図10. 栄養濃度 C_n と指数 b の関係。

C_x を b が最小値を取るときの値 $C_x = 0.40 \text{ g/L}(C_5)$ 、寒天濃度を $C_a = 6.0 \text{ g/L}$ に固定し、栄養濃度 C_n をパラメータとしたときの成長速度 v 、指数 b の振る舞いを調べた。その結果、 v は C_n に比例して増加し、 b も C_n に比例して増加することがわかった。すなわち、 C_n を高くすることにより v が速くなり、その結果、培地表面の凹凸ノイズが枝の分岐頻度を高めることになったと考えられる。これらのことから、 $b=g(v(C_x))$ の増加傾向の振る舞いを C_n をパラメータとすることにより確認できた。

以上より、サーファクチンが枝分かれに与える影響は図6で示した $b=f(C_x)$ で表される減少傾向の振る舞いと、 $b=g(v(C_x))$ で表される増加傾向の振る舞いの重ね合わせによって決まっていると考えられる。

第6章 参考文献

- [1] M. Matsushita, F. Hiramatsu, N. Kobayashi, T. Ozawa, Y. Yamazaki, and T. Matsuyama, *Biofilms* 1, 305 (2004).
- [2] J. Wakita, I. Rafols, H. Itoh, T. Matsuyama, and M. Matsushita, *J. Phys. Soc. Jpn.* 67, 3630 (1998).