

緑膿菌コロニーのパターン形成

Pattern Formation of Colonies by *Pseudomonas aeruginosa*

物理学専攻 小谷野 真利子
Dept. Physics Mariko Koyano

◇研究目的

本研究では具体的なテーマとして、バクテリアを扱う。最も単純な生物個体であるバクテリアの、個々の生物体組織の形態形成そのものでなく、生物集団の振舞いとそれにより形成されるコロニーのパターンに焦点を当てる。半液体培地の表面上に2次元的に広げられたバクテリアコロニーのパターン形成は、その鍵となるバクテリアの運動と増殖を培地の環境条件（寒天濃度と栄養濃度という物理的条件）により支配することができる。一般に生物の織り成す形態形成は物理・化学系よりも一層複雑に見えるが、バクテリアコロニーの場合、環境条件によってそのパターンを様々に変化させるのである。パターン形成の研究においてマイクロからマクロへの展望を観察できるバクテリアコロニーは最適である。マイクロサイズの一体一体のバクテリアが運動と分裂を繰り返し拡大したコロニーはマクロスケールの培地上に多様な形を展開し、得られたMorphological Diagramは、その1つを取って見ても環境条件や菌自身の形態や性質などの個性によってコロニー全体の形態が変化するのだが、他の菌のMorphological Diagram同士を比較すると共通の変移などが見えてくるのである。

本研究で目をつけたのが緑膿菌である。緑膿菌はクオラムセンシングと呼ばれる情報伝達機構を持つことや、バイオフィームを形成する代表的な菌として知られている、複数の薬剤耐性メカニズムを保持する為、特に医学上重要視されている菌の一つなのである。この論文では緑膿菌が単純な実験系でどのような二次元的コロニーパターンを形成するのか、培養環境によりどのような変化を見せるのかを調べ、Morphological Diagramとそこで見られた菌の状態の変化、周期的パターンについて報告する。

◇実験方法

この実験は基本的に以下の手順で行う。

- ① 菌を普通寒天培地に植え、恒温恒湿器で1日程度培養しシングルコロニーをつくる。
- ② 生理食塩水で①で培養した菌を希釈し、OD=0.5の菌液を作成する。
- ③ 実験用寒天培地（直径90mm厚さ約3mm）を作成し、②の菌液を3 μ l接種し培養する（温度37 $^{\circ}$ C、湿度90%）。
- ④ 観察、撮影、解析を行う。

◇結果① Morphological Diagram

寒天濃度 (C_a) と栄養濃度 (C_n) の2つの環境条件をパラメータとして緑膿菌コロニーが形成するパターンを調べMorphological Diagramを作成した(図1)。緑膿菌のMorphological Diagramは大きく分けてA, B, Cの3つの領域に分類できる。培地が軟らかいC領域では菌がコロニー中に潜り込みswim型の運動性を示し、寒天濃度を上げるとA領域・B領域では培地表面上にswarm型の運動性により様々な2次元パターンのコロニーが作られる。そのなかでA領域とB領域では菌の状態が異なっており、B領域では1つのコロニーの中に異なる成長モードが見られた。C領域を1つに数え、A領域に4種、B領域に2種と総じて7種類の特徴的なコロニーパターンが形成される。

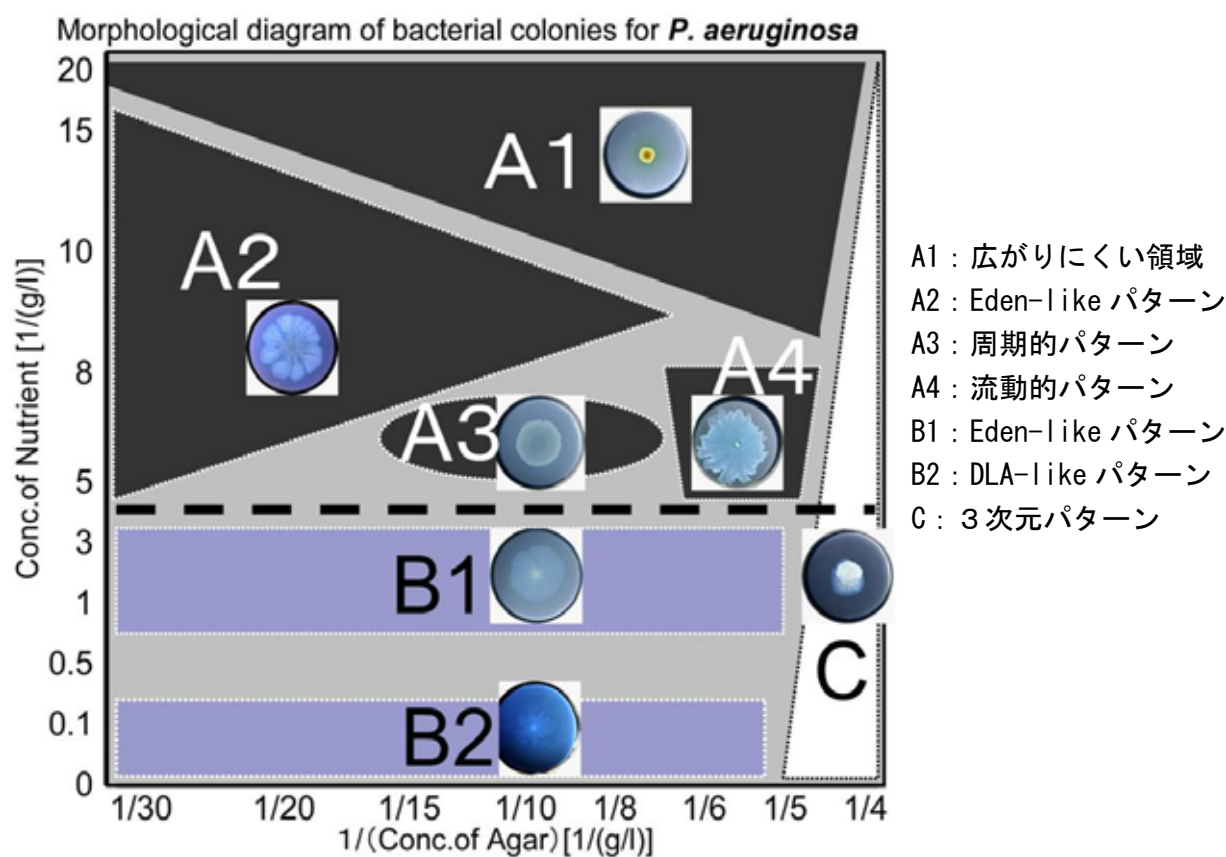


図 1 : 緑膿菌の Morphological Diagram

A領域では、高栄養濃度領域ではコンパクトなパターン(A1領域)になり、ダイアグラムの中央に周期的パターンを示す(A3領域)。低寒天濃度領域では流動的な様子を見せ(A4領域)、寒天濃度を上げるとEden-likeパターンとなる(A2領域)。A2領域では栄養濃度を下げると徐々に外形に溝が生じ、コロニー内部には網目構造が確認できる。さらに栄養を下げると樹枝状パターンになる。B領域では、B領域はA領域に比べコロニー成長速度が遅くコロニー全体の菌密度が低い。Eden-likeパターン(B1領域)から栄養濃度を下げることによってDLA-likeパターン(B2領域)に変わっていく。菌の成長モードの変化により、コロニー表面にはEden-likeパターンには斑点模様、DLA-likeパターンには縞模様が見える。

◇結果② 菌の状態の変化

Morphological Diagram の A 領域から B 領域へと成長が遅く半透明のコロニーへと変化した。さらに植菌したエリア近傍からコロニーの成長とともに異なる成長モードを持つものへ派生し、Morphological Diagram の B1 領域と B2 領域の領域でそれぞれ、斑点模様や縞模様などマクロスケールもわかる変化が観察された。両者における菌の性質の変化は同様のものと確認し、再現性の高さより B1 領域の斑点模様で菌の性質の変化を調べた。

状態の異なる部分の菌をそれぞれ α 、 β 、 γ の 3 つに分類しその特徴を示す (図 2. 表 1)。

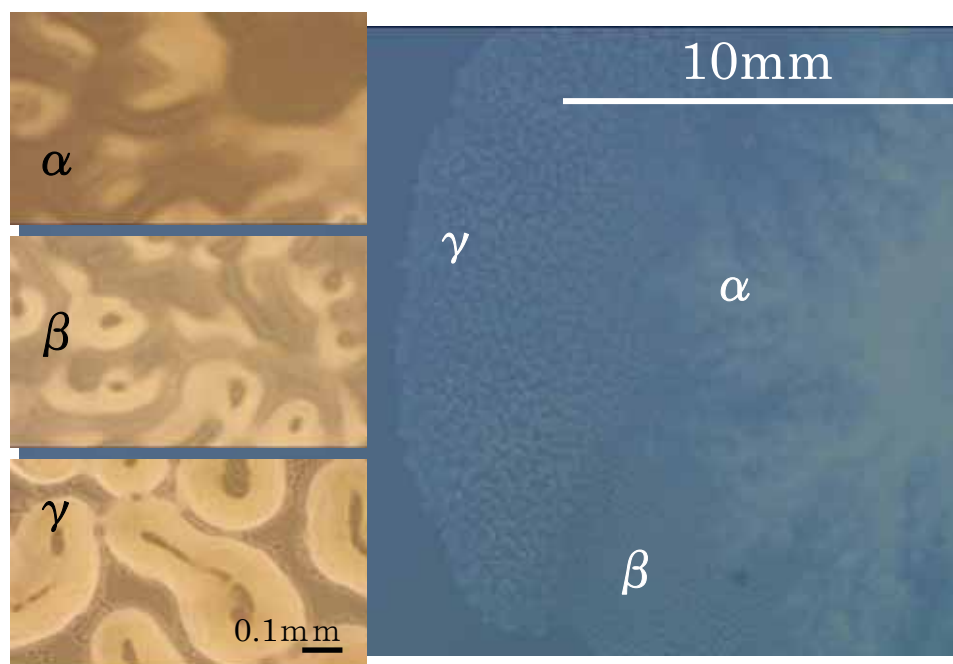


図 2 : 状態が変化した菌 (環境条件 : $C_a=16.0[\text{g/l}]$, $C_h=3.0[\text{g/l}]$)

表 1 : 状態が変化した菌の観察結果

	マクロ観察	ミクロ観察	時間変化観察
α	接種点付近に生じた樹枝状構造。	凹凸が少なく、全体的に一様に広がっている面が多い。	成長スピードは遅く、厚みのある界面から細い菌集団が伸びコロニーを拡大している。
β	粒の細かい斑点模様。コロニー面積は小さく菌密度は低い。	ところどころに小さい山があるが、大部分が一様に広がっている。	厚みのある界面から同程度の高さのある菌集団が伸び、コロニーを拡大している。
γ	粗い斑点模様やそれらがつながった迷路のような模様。コロニー面積は広いが菌密度は低い。	全体的に凹凸があり山脈のようになっている。	薄い界面から小さな菌集団が自由に飛び出し、活発に動き回りながらコロニーを拡大している。

菌を接種した後最初に α が広がり、その後高確率で β 、 γ の状態が出現する。変化後の β 、 γ は新たな培地や環境条件を変えた培地に植えてもオリジナルの菌株とは異なる様子を見せた。そして α から β への変化は見られるものの、逆の変化は示さなかった。

◇結果③ 周期的パターン

周期的パターンの濃淡における菌のサイズには違いは見られなかった。時間変化観察では成長界面の明確な進行と停止を繰り返すような周期的な特徴は確認できず、またマクロで見える周期はコロニーが成長した後にはっきり見えるようになる。

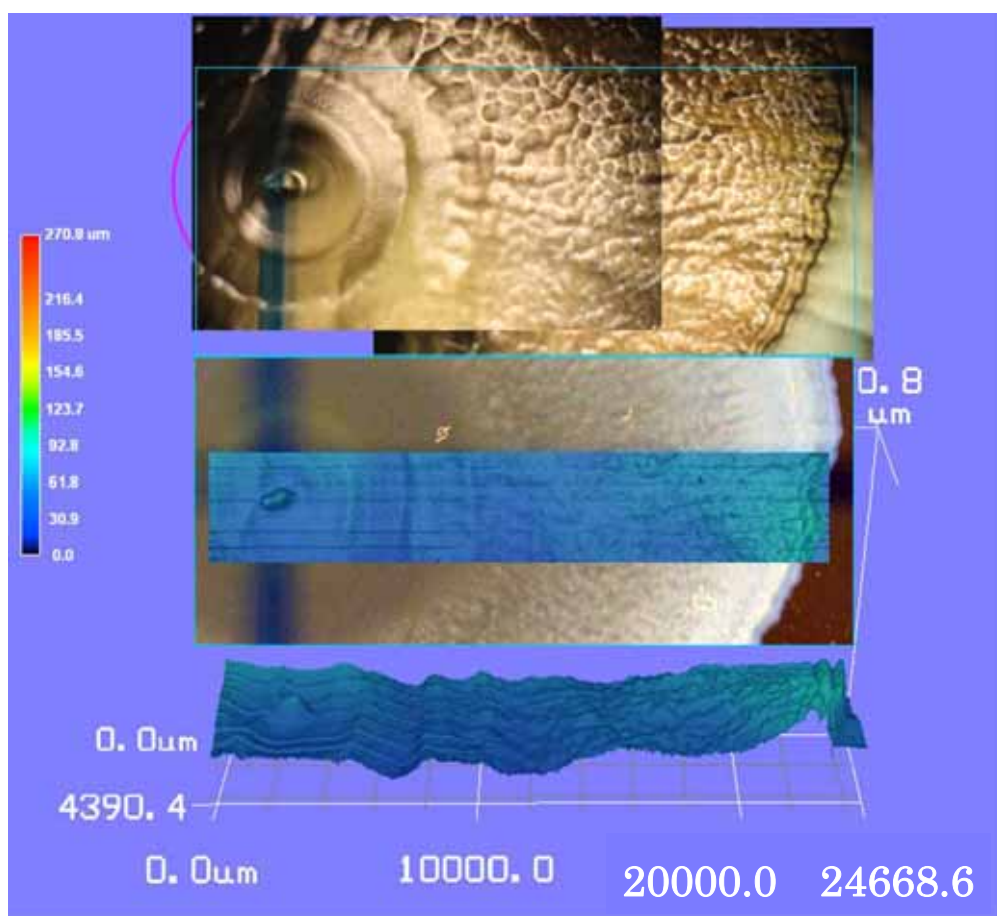


図 3：周期的パターンの3次元測定結果

環境条件： $C_a=10.0$ [g/l]， $C_h=6.0$ [g/l]

(青い色の線はシャーレの裏にペンで書いた印である。)

顕微鏡による上からの観察では、接種点から1 cm以内の一様なエリアに見える周期はわかるもののそれ以降はコロニー表面の凹凸の他に周期的なものは見えない。しかし高さプロファイルにより、周期的パターンは山脈のような菌密度によって形成されていることがわかる(図3)。緑膿菌の周期的パターンは全体の高さは約 $10.8\mu\text{m}$ の薄いコロニーに見られる。