

『大腸菌コロニーのパターン形成』

Pattern Formation of Colonies by *Escherichia coli*

物理学専攻 時田理恵

Rie TOKITA

研究の目的

バクテリア・コロニーのパターン形成について、医学や分子生物学等でポピュラーな菌である *Escherichia (E.) coli* (MG1655 株) を用いた実験を行い、そのパターンの特徴や形成機構を探るのが本研究テーマの展望であるが、現在までに様々な系で共通に見えるパターンが報告されているにも拘らず、それらのパターンの特徴や形成機構が記述される法則に関しては、典型的なパターンを除いてまだはっきり理解されていないのが現状である。従って当面はその前段階として、先行して研究されてきた *Proteus (P.) mirabilis* や *Bacillus (B.) subtilis* のコロニーパターンの特徴と、*E. coli* (大腸菌) コロニーのパターンとを実験を行って比較することにより、*E. coli* コロニーの代表的なパターンを明確にし、普遍的なコロニーパターンを模索する上で新たな現象 (見解) を提示することを行う。また次のステップとして、代表的なコロニーパターンの一つでもある周期的成長パターンに着目し、その特徴や形成メカニズムを考察することを目的とする。

内容

寒天培地上に少量の *E. coli* を接種すると、適当な環境条件下で数 cm の大きさのコロニーに成長する。寒天濃度 (C_a =Concentration of Agar) と栄養濃度 (C_n =Concentration of Nutrient) の2つの量をパラメータとして、コロニーパターンの示す多様な振る舞いを実験により調べ、その結果をダイアグラムにまとめた (成果1)。

他のバクテリア (*P. mirabilis*, *B. subtilis*) を用いた研究報告でも共通して見られている周期的成長パターン [1,2] に着目し、その空間的な周期のパラメータ (C_a , C_n) 依存性を実験により明らかにした。先行研究では、寒天濃度 (C_a) を大きくすると空間周期は

減少するが、栄養濃度 (C_n) に対して空間周期は依存しないという実験結果が報告されている [3,4]。そこで *E. coli* でも同様の実験を行うことにより、*E. coli* の周期的成長パターンの特徴を比較・考察した (成果2)。

また、菌の進行の開始が初期菌密度 (OD (= Optical Density)) に依存しているのかどうかを確認することは非常に重要である。*P. mirabilis* や *B. subtilis* の報告によると、 OD を変化させることによって Lag phase time (菌を接種してから広がり始めるまでに要する時間) が変化する (OD が高い数値の時は Lag phase time が短くなる) ということが調べられている [5,6]。このことが *E. coli* に対しても当てはまるかどうかを実験的に調べ、更にそのパラメータ依存性についても確認・比較を行った (成果3)。一方で、Lag phase 終了直後の菌密度を議論するには、バクテリア・コロニーの高さ方向に対する分布を確認する必要がある。そこで、Lag phase 終了直後のコロニーの3次元なプロファイリングも行い、コロニーの成長開始が菌密度に依存しているのかどうか、3次元共焦点顕微鏡を用いて測定を行った (成果4)。

また、ミクロとマクロの階層別に特徴をまとめることはパターン形成メカニズムを探る上で大変重要である。観察の基本でもある動的な周期的パターンの成長過程を、光学顕微鏡やデジタルカメラを用いて行った (成果5)。

成果

1. モルフォロジー・ダイアグラム

E. coli は DLA-like パターン、Eden-like パターン、周期的成長パターン、流動的パターンの4つの特徴的なコロニー・パターンを形成することがわかった (図1)。 C_a は運動性を、 C_n は菌の増殖率をコントロ

ールするパラメータである。以下、各パターンの特徴をまとめる。

DLA-like パターンを示す A 領域は、培地が非常に固く、栄養濃度は極めて低い。バクテリアにとっては能動的に動けず、増殖しにくい環境である。ここで見られるパターンは viscous finger や電解析出、しのぶ石の表面に析出した樹枝状のパターンなどでも見られる DLA パターンに良く類似している。生物・非生物に関わらず、あらゆる系で共通して見られるパターンである。*P.mirabilis* や *B.subtilis* でも観察されており、非局所的な栄養の拡散がラプラス方程式を満たして拡散律速的な成長を行うことが知られている。また、この領域でのパターンは写真の状態に広がるまでに約 1 ヶ月間を要するなど他のパターン領域に比べ、成長速度が非常に遅いという特徴を持っている。

次に Eden-like パターンを示す B 領域について特徴をまとめる。この領域は、培地の栄養濃度が非常に高く、バクテリアが増殖するには申し分ない栄養豊富な領域である。ここでの 1 つの大きな特徴として、このパターンが見られる領域が培地の硬さ (C_a) に依存しないという特徴が挙げられる。この特徴は、*B.subtilis* とは異なっている[2]。即ち、栄養濃度がある一定値以上になるとこのパターンが現れるようになるという特徴がある (*P.mirabilis* は個々の運動性が非常に高いため Eden パターンは形成されない[1])。また、成長スピードは周期的成長領域と比べると、差渡し 3cm 程に成長するのに約 1 週間程度かかり、遅い。その理由として、わざわざ菌が移動して栄養を獲得しなくても、生きていけるだけの栄養が培地から接種出来るという事が考えられる。

周期的化学反応である BZ 反応やアスコルビン酸の同心円状パターンなど非生物系でも興味深い周期的成長パターンは、*P.mirabilis* や *B.subtilis*、*S.marcescens* と同様に *E.coli* でも観察されることがわかった。バクテリアの種類によって菌の広がり方や密度の分布状態など見た目(マクロ)にも細かな特徴(ミクロな様子)は異なっているものの、どの菌で実験しても周期性を持ったパターン現れたという点では大変興味深い。詳しい特徴は以下(成果 2 以降)に譲るが、この周期性が成長先端部分の菌密度に関与

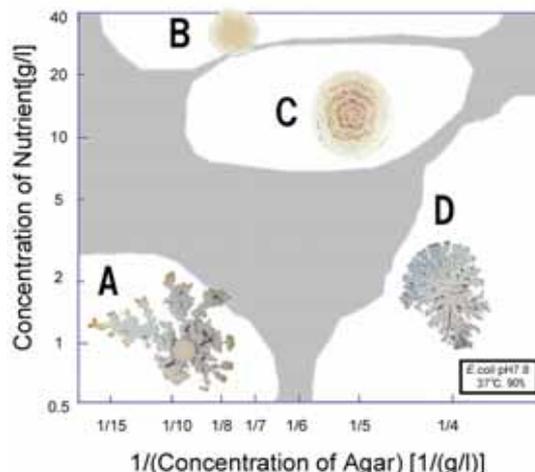


図 1: *E.coli* のモルフォロジー・ダイアグラム。A 領域: DLA-like パターン、B 領域: Eden-like パターン、C 領域: 周期的成長パターン、D 領域: 流動的パターン。



図 2: 周期間隔 $L(n)$ と周期幅 $W(n)$ の対応。

している可能性が過去の実験により示唆されている[5,6]。それがバクテリアの種類に関係なく *E.coli* にも有効であるかの確認が必要だろう。この領域のパターンがシャーレいっぱい成長しきるまでには、約 1~2 日間かかり、DLA-like パターンや Eden-like パターンよりも成長が早い。

D 領域は、寒天濃度が非常に低いため、培地は水に近く非常に軟らかい。よってバクテリアは運動しやすく、流れるようなパターンを描く。成長スピードは速く、半日~1 日程度でシャーレいっぱい広がる。

2.空間周期の C_a, C_n 依存性

パラメータ C_a の空間周期 L, W (図 2 参照) に対する依存性は、図 3 の通り、培地が固くなれば硬くなるほど狭まり、ある値以上固くなると一定値に漸近する傾向が見られた。これは、菌集団の運動性が寒天濃度により制御された結果と考えられる。この傾向は *P.mirabilis* や *B.subtilis* で得られた実験結果と一致する。

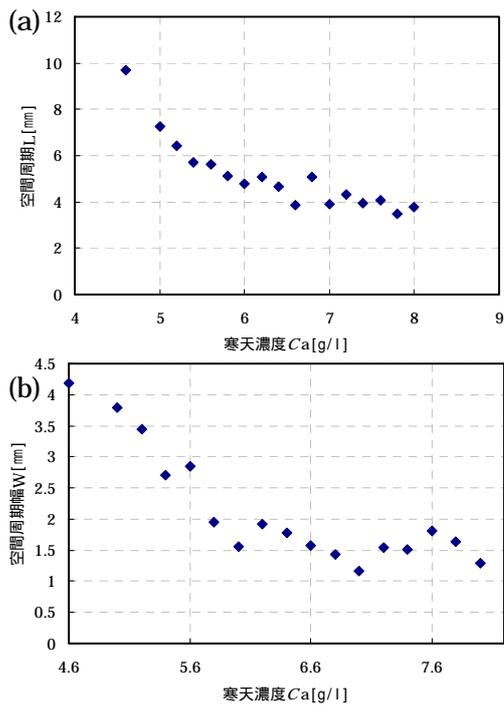


図 3: (a) C_a と空間周期 L の関係。 (b) C_a と空間周期幅 W の関係。栄養濃度はどちらも 20[g/l] に条件を固定。

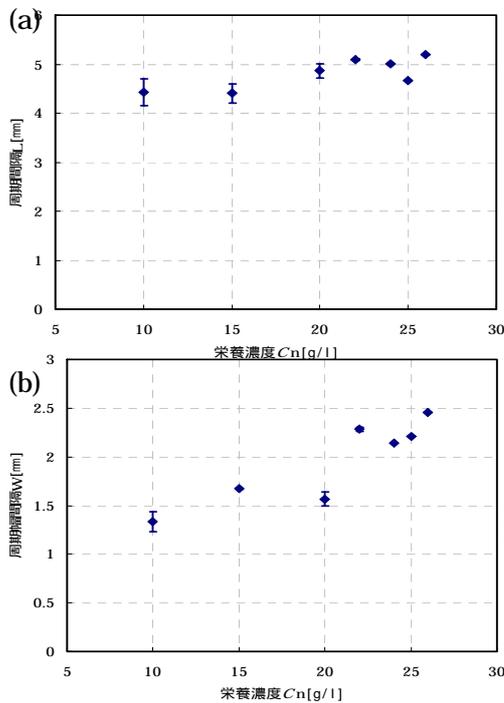


図 4: (a) C_n と空間周期 L の関係。 (b) C_n と空間周期幅 W の関係。寒天濃度 (C_a) はどちらも 6[g/l] に条件を固定。

パラメータ C_n の空間周期 L, W に対する依存性は、図 4 のような結果が得られた。周期間隔 L は C_n 依存しない様子が窺える一方で、周期幅間隔 W を見ると

その様相は明らかに異なり、栄養濃度 (C_n) が大きくなると W も増加するということがわかった。

3. OD と Lag phase time

P.mirabilis や *B.subtilis* の先行研究結果同様、*E.coli* に対しても OD を変化させることによって Lag phase time が変化するということがわかった (図 5)。このことから、菌の進行開始が初期菌密度 (OD) に依存している可能性は高まったといえる。また、そのパラメータ依存性についても確認したところ、周期的成長領域では菌の増殖率が変化しないことが示唆される結果を得た (図 6)。

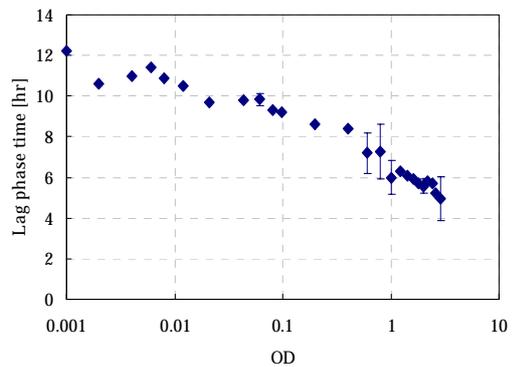


図 5: Lag phase time と菌密度の関係。パラメータ条件は $C_a=6.0$ [g/l], $C_n=20$ [g/l] に固定して計測を行った。

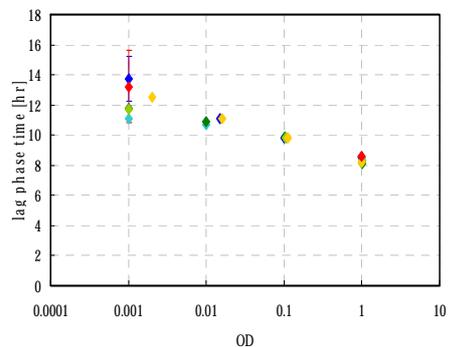


図 6: Lag phase time と菌密度のパラメータ依存性。

4. Lag phase の profile

Lag phase 終了直後のバクテリア・コロニーの高さ方向に対する分布を確認したところ、パラメータや O

D に関係なく、一定密度値以上になるとコロニーの進行が開始されることがわかった (図 7)。

4. Lag phase の profile

Lag phase 終了直後のバクテリア・コロニーの高さ方向に対する分布を確認したところ、パラメータや OD に関係なく、一定密度値以上になるとコロニーの進行が開始されることがわかった (図 7)。

5. 観察

光学顕微鏡を用いてバクテリア・コロニーの成長の様子を観察してみると、*E. coli* は単一な層ではなく多層構造をとり、個々の菌の運動性は低い替わりにある大きさの集団を形成しながら運動している様子が観察された。周期的成長パターンの成長界面は、進行をしながら成長先端の菌密度が徐々に上昇し、成長界面の至る所で、ある大きさの菌の集団が飛び出す様子が観察された。突出した集団は隣から突出してきた集団とぶつくと融合して (消滅、均一化されるのではなく) 更に大きな集団となり、ある一定の大きさに達すると一瞬ではあるが界面は停止する。大きくなった集団はその場に取り残され停止し、界面から新しく小さな集団が突出してフロント部分は進行を開始する。先行研究の *P. mirabilis* や *B. subtilis* と比較すると、*E. coli* は集団を形成して運動をする傾向が強いと思われる (顕微鏡でリアルタイムの菌を観察しても、活発な動きは観察されなかった)。小さなクラスターは動きやすく、ある一定のサイズに達すると動きにくくなるといった、運動しやすい菌集団のサイズを独自に持っているのかもしれない。

結論

- モルフォロジー・ダイアグラムの確立により、代表的な 4 つのコロニー・パターンが形成されることがわかった。
- 周期的成長パターンの空間周期 L は C_a の増加に対して減少する傾向あり、 C_n には依存しない。空間周期幅 W は C_a にも C_n にも依存する。
- バクテリアの進行開始には、菌密度が深く関わっている可能性がある。

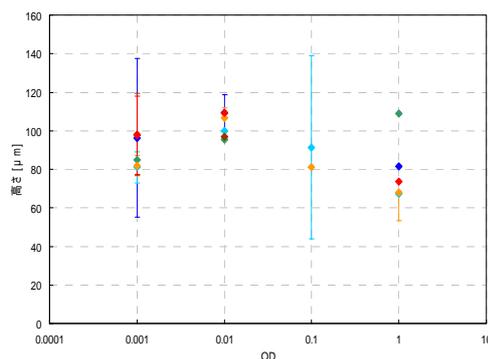


図 7: Lag phase の profile データをパラメータ毎にプロットしたもの。縦軸が Lag phase 終了直後のコロニー端側の高さ [μm]、横軸は初期菌密度 (OD) の対数を取っている。

- Lag phase での菌の増殖率は、パラメータ C_a, C_n に依らない。
- Lag phase ではバクテリア・コロニーの進行開始に菌密度の閾値が存在する可能性を示唆された。
- 周期的成長パターンは、成長界面の進行と停止を交互に繰り返すことで形成される。
- *E. coli* は、コロニー集団の運動性が高く、個々の菌の運動性は低い。

参考文献

- [1] A. Nakahara *et al.*: J. Phys. Soc. Jpn, **65** (1996) 2700
- [2] M. Ohgiwari *et al.*: J. Phys. Soc. Jpn, **61** (1992) 816
- [3] O. Rauprich *et al.*: J. Bacteriology, (1996) 6525
- [4] J. Wakita *et al.*: J. Phys. Soc. Jpn, **70** (2001) 911
- [5] H. Itoh *et al.*: J. Phys. Soc. Jpn, **68** (1999) 1436
- [6] H. Shimada *et al.*: J. Phys. Soc. Jpn, **73** (2004) 1087