

B. subtilis コロニーの同心円状パターン成長機構 Growth Mechanism of Concentric Ring Pattern for *B. subtilis* Colony

物理学専攻 熊田龍人

Department of Physics, Ryuto Kumata

1・はじめに

バクテリアは寒天培地上に接種されると、増殖を繰り返しながら2次元のコロニー・パターンを形成する。それは寒天培地の寒天濃度 (C_a) と栄養濃度 (C_n) によって異なり、今回試料として取り扱っている *B. subtilis* のコロニーが形成するパターンの場合は5種類に分類される (図1)。本研究では C 領域の同心円状パターンに注目している。同心円状パターンは進行 (migration) と停止 (consolidation) を周期的に繰り返すことで形成されるパターンであり、*B. subtilis* だけでなく *P. mirabilis* や *E. coli* などの菌でも観察され、さらに生物だけでなくアスコルビン酸の結晶成長でも見られるパターンである。

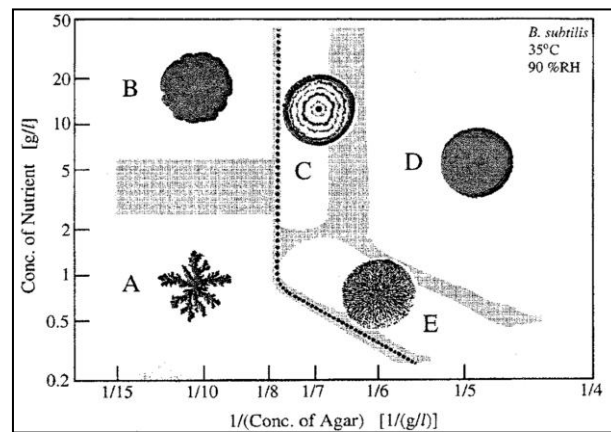


図1: *B. subtilis* のモルフォロジー・ダイヤグラム

先行研究で明らかになっていることは、まず、時間と空間周期の寒天培地依存性である。時間周期とは migration time と consolidation time、そしてその合計である cycle time で、空間周期はリング1テラスの幅 (migration phase でどれだけコロニー界面が進行したか) を指す。 C_a をパラメータとした場合には、 C_a 増加に伴い、migration time は短くなるが、consolidation phase が長くなり、cycle time は一定になる。テラス幅は C_a に高くなると短くなる。 C_n をパラメータとすると、時間周期と空間周期はともに C_n に依存せず一定である。

次に、菌密度とコロニー界面の進行、停止の関係である。寒天培地に接種する菌の初期菌密度が高くなると、それに伴い接種した場所からコロニーが進行するまでの時間 (lag phase time) が短くなる。そして、migration phase 開始直後に後方のテラスを取り除き、菌の供給を無くすと、migration time が短くなる。しかし consolidation time は長くなり、cycle time はテラスを取り除いていない通常のものと同様で一定となる。この周期性が一定となるという結果は、*B. subtilis* の同心円状パターンの形成にとって、重要な要素であることを示し、さらに、コロニー界面の進行と停止には、菌密度の閾値が存在するというを示唆している。

2・目的

本研究の目的は、(1)まずコロニー界面進行に寄与するのが成長先端部なのか、1テラス全体なのかを調べること、(2)その部分の高さプロファイルを計測することで、先行研究により示唆されている、migration phase 開始時の菌密度閾値の存在を確かめ、同心円状パターンの成長機構を理解することである。

3・結果

培地条件は下の表のようになっている。

培地条件

	C_a (g/l) Agar					
C_n (g/l):30	7.5	7.75	8.0	8.25	8.5	
	C_n (g/l) Peptone					
C_a (g/l):8.0	20	25	30	35	40	45

(1) リング 1 テラスの 15 分毎のプロファイル測定

リング 1 テラスの高さを 15 分毎に測定し、その時間変化を調べた結果(図 2)、後方からの菌の移動を、波形から確認することはできず、また顕著な変化をしているのが成長先端部であることが分かった。この実験により、後方からの菌の移動はなく増殖のみで菌密度が高まっていること、migration phase 開始に寄与しているのは先端部のみであることが考えられる。

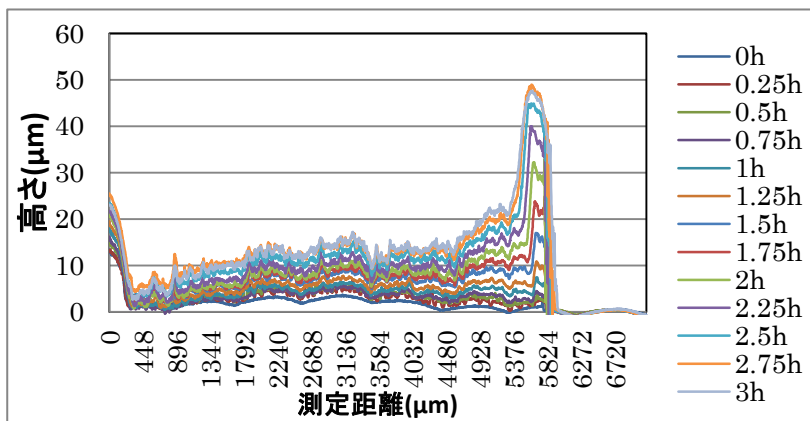


図 2 : consolidation phase 開始時からの 15 分毎の高さプロファイル(1 テラス)

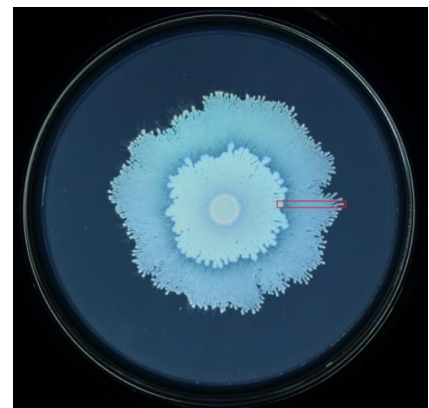


図 3 : リング 1 テラスの定義 (線で囲まれた部分が 1 テラス)

(2) 切除実験

次に、consolidation phase 中にコロニーの一部を切除し、成長先端部のみの状態で migration phase に移行するか確かめる実験を行った。これは、consolidation phase 中に後方からの菌の移動がないこと、着目すべきは成長先端部のみであることをより確かなものにするための実験であり、その結果は下の図 4 である。



migration phase-3h

migration phase 開始

migration phase+6h

図 4 : consolidation phase 初期に成長先端部のみを残した実験

成長先端部のみであっても migration phase は開始し、さらに consolidation time にも変化はなかった。通常の場合後方から菌が供給されているのなら、今回の実験ではそれが無いということになるので consolidation time が長くなるはずだが、結果は変わらなかった。よって後方からの菌の移動は無く、migration phase 開始には成長先端部のみが重要である、ということが言える。

(3) migration phase 開始時の成長先端部の高さ

成長先端部の高さを菌密度に対応させ、migration phase 開始時の最高点の高さを測定した結果、 C_a をパラメータとした場合の高さは一定であったが、 C_n をパラメータとした場合には、 $C_n = 30$ [g/l] と 35 [g/l] で結果に大きなジャンプが見られた(図 5)。先行研究ではリングの時間周期や空間周期などの巨視的な量は C_a には敏感に反応し、 C_n には依存しないため、そこから直観的に予想されるように、 C_a の増加に関しては高さが高くなり、 C_n には依存せず一定値を取る、というものとは異なる結果が得られた。つまり、成長先端部の最高点の高さという局所的な量を菌密度に対応させるのは適切ではないと考えられる。

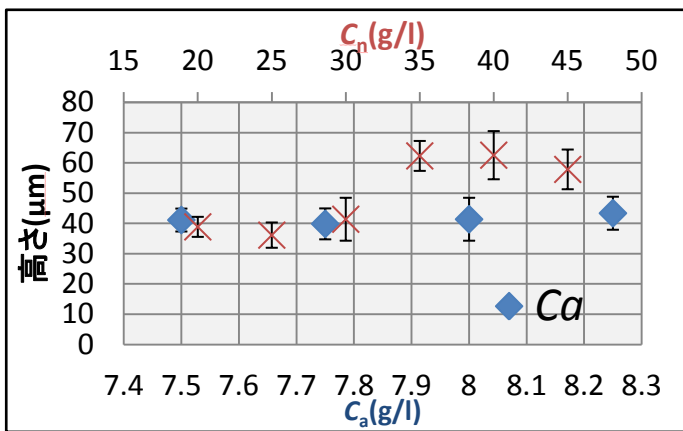


図 5: migration phase 開始時の成長先端部の高さ(菌密度)

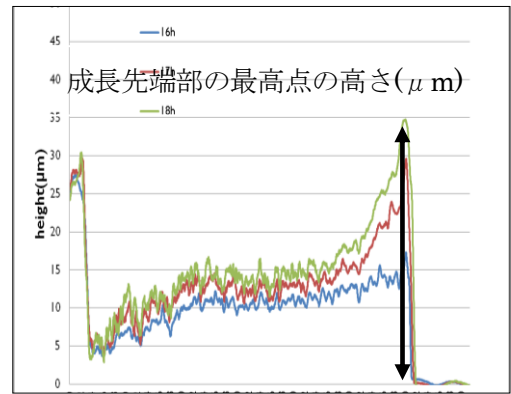


図 6: 測定した場所(先端部の最高点)

(4) migration phase 開始時の成長先端部の高さ平均値

成長先端部の最高点の高さという局所的な量ではなく、幅を考慮した高さ平均値(平均菌密度)を測定した結果が下の図 7 である。 C_a と C_n のどちらをパラメータとした場合でも一定の高さ平均値が得られた。このことから、先行研究で示唆されているように、migration phase 開始には、菌密度の閾値が存在することが確認され、それは培地条件に依存しないことが分かった。

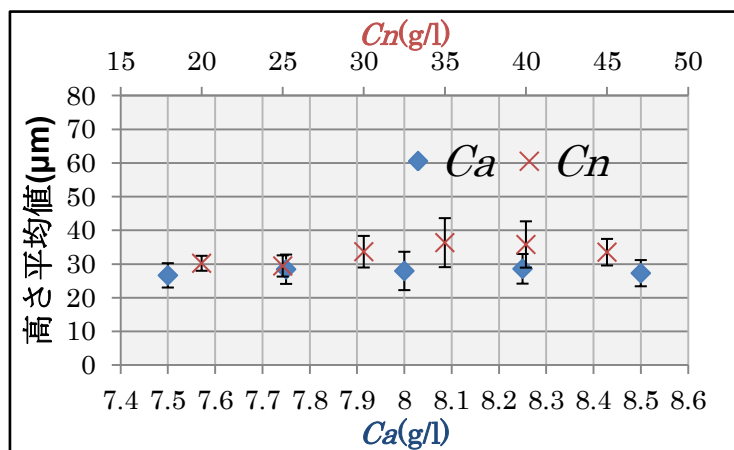


図 7: migration phase 開始時の成長先端部の高さ平均値(平均菌密度)

(5) C_a をパラメータとした migration phase 開始時とそれまでの高さ平均値

C_a をパラメータとした場合に、閾値が一定になる理由を調べるため、migration 開始時とそれまでの高さ平均値の測定を行った結果が図 8 である。consolidation 開始時から同時刻の高さ平均値が C_a の増加に伴い、小さくなっているのがわかる。その原因として考えられるのは、 C_a によって増殖率が異なるため、もしくは、初期菌密度が異なるための 2つが考えられるが、consolidation 開始から 2.0h と 2.5h の高さ平均値の差がほぼ一定であるため、初期菌密度が異なることによって生じた結果であるといえる。さらに、後方からの菌の供給を無くした状態で形成されたテラスの、migration 開始時とそれまでの高さ平均値を測定したところ、30 分の時間遅れで、ほぼ同じ値が得られた。これは全ての C_a について同じであり、この結果からも、増殖率が異なるのではなく、初期菌密度が異なることが、migration 開始の閾値に達するのに時間が異なること(consolidation time の違い)の理由であると考えられる。

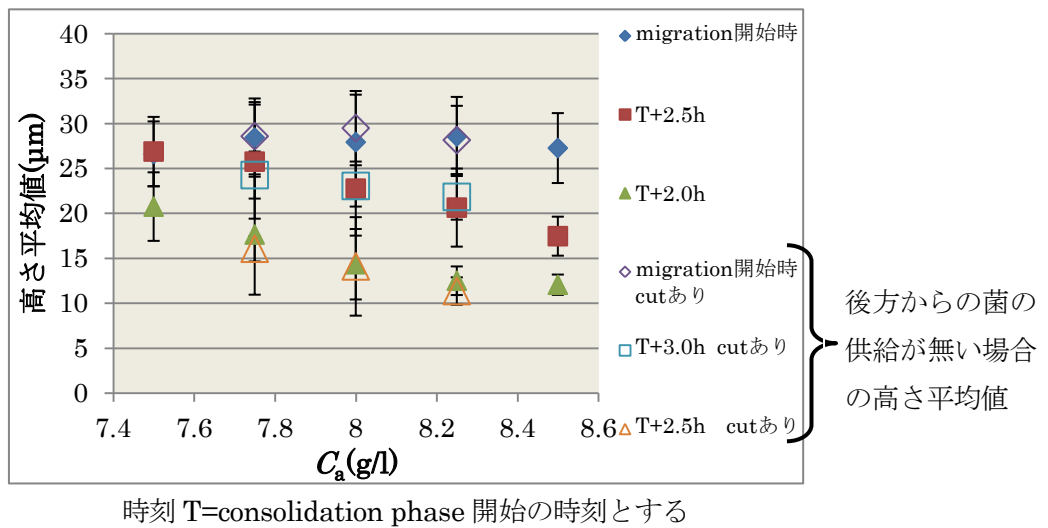


図 8:migration 開始時とそれまでの高さ平均値(白抜きは後方からの菌の供給が無い場合での結果)

参考文献

[1] H. Shimada, T. Ikeda, J. Wakita, H. Itoh, S. Kurosu, F. Hiramatsu, M. Nakatsuchi, Y. Yamazaki, T. Matsuyama and M. Matsushita: J. Phys. Soc. Jpn. **73** (2004) 1082-1089.

[2] Y. Yamazaki, T. Ikeda, H. Shimada, F. Hiramatsu, N. Kobayashi, J. Wakita, H. Itoh, S. Kurosu, M. Nakatsuchi, T. Matsuyama and M. Matsushita: Physica D **205** (2005) 136-153.

[3] J. Wakita, H. Shimada, H. Itoh, T. Matsuyama and M. Matsushita: J. Phys. Soc. Jpn. **70** (2001) 911-919.

[4] K. Iwamoto, S. Mitomo and Seno: "Rhysmic Crystallization of Ascorbic Acid Precipitated from Its Methanol Solutions" J. Colloid. Interface Sci. No.2 **102**(1984) 477-481

[5] 脇田 順一：1996 年度 博士論文 (バクテリア・コロニーの形態形成)

[6] 島田 宏俊：2001 年度 修士論文 (バクテリア同心円状コロニーの形成)

[7] 松下 貢：フラクタルの物理(I)基礎編 (裳華房, 2002)

[8] 松下 貢：フラクタルの物理(II)応用編 (裳華房, 2004)