

1. 背景

シャーレ内に作った寒天培地上に大腸菌 (*Escherichia coli*、*E. coli*) の菌液を少量接種すると、増殖と運動によって培地表面上に巨視的サイズのコロニーが形成される。培地の寒天濃度 C_a と栄養濃度 C_n という 2 つのパラメータにより、コロニー・パターンは A~D 領域の 4 種類に分類される (図 1 参照)。この中でも C 領域の同心円状パターンは、巨視的スケールでは、コロニー成長先端部の菌集団が進行期 (migration phase) と停止期 (consolidation phase) を周期的に繰り返す様子が確認されている。また、上記 2 つの期間とは別に、菌液を接種してからコロニーが成長を開始するまでに 6 時間程度の潜伏期間 (Lag phase) が存在する。微視的スケール (顕微鏡スケール) では、ある菌密度に達してコロニーが成長を開始する際、菌液接種点より複数の小さな菌集団 (初期菌集団) が形成され、飛び出す様子が確認されている。その後、これら初期菌集団は増殖により体積を増加させながらコロニー外側に向かって進行し、コロニーの成長を駆動する (migration phase)。そしてある菌密度に到達したところで、停止する (consolidation phase)。停止後も増殖により菌集団は体積を増加させ、間もなくそれら停止した菌集団より、新たな初期菌集団が飛び出す。以後、この一連のプロセスを繰り返すことにより、周期的な同心円状パターンが形成されるのである。また、3rd migration phase 開始時の初期菌集団を構成する菌のサイズ (面積) が測定され、その分布が対数正規分布に従っていることが知られている。このことから、その背後に何らかの歴史を背負った乗算的な成長過程が存在すると考えられている。

Bacillus subtilis (*B. subtilis*: 枯草菌) のコロニーにおける菌体長分布も、対数正規分布に従っていることが確認されている。*B. subtilis* が増殖する背景には、菌の成長と分裂が存在している。このことから、菌体長分布が対数正規分布に従う要因として、成長速度と分裂周期に焦点を当てて研究が行われた。まず菌体長が時間に対して線形に成長することから、菌の成長が乗算過程的であることは否定された。次に、分裂周期の分布と成長速度の分布が、両方とも対数正規分布に従っていることが確認された。ここで実験結果に基づく現象論モデルに、成長速度と分裂周期を実験で得られた対数正規分布関数を再現する乱数として与えて菌体長分布をシミュレーションした結果、実験結果をよく再現できることが分かった。一方で、成長速度と分裂周期を正規分布関数として与えると、対数正規分布が再現されないことが確認された。これより、分裂周期と成長速度の分布が対数正規分布に従うことが、菌体長分布が対数正規分布に従う要因であると考えられている。

また *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) の同心円状パターンにおける菌体長の測定も行われている。*P. mirabilis* は大腸菌とは異なり、菌体長が短く (約 $1.5\sim 2.0\ \mu\text{m}$) 運動性が弱い swimmer cell と、菌体長が長く (約 $10\sim 80\ \mu\text{m}$) 運動性が強い swarmer cell との 2 状態間で“分化—脱分化”の周期的なサイクルを示す。図 2 の (A) のように観測点を点 y と点 z に固定して、migration phase 開始時 (図中の Early swarming phase) から次の migration phase 開始時までの 1 周期における菌体長分布の時間変化が調べられ、その結果が (B) (点 y での結果) と (C) (点 z での結果) に示されている。周期の始めは swarmer cell が高い割合を占めているが、周期の終わりに近づくとともに swimmer cell が占める割合が増えていくことが分かる。(B) の時刻 0 からスタートし、1 時間後、(C) の 2、3、4、5 時間後、そして再び (B) の時刻 0 に戻ってみると、ちょうどコロニーの周期的成長と菌の“分化—脱分化”のサイクルが対応している様子が分かる。これより *P. mirabilis* の“分化—脱分化”の性質が、同心円状コロニーの周期的な成長メカニズムと深く関係があると考えられている。

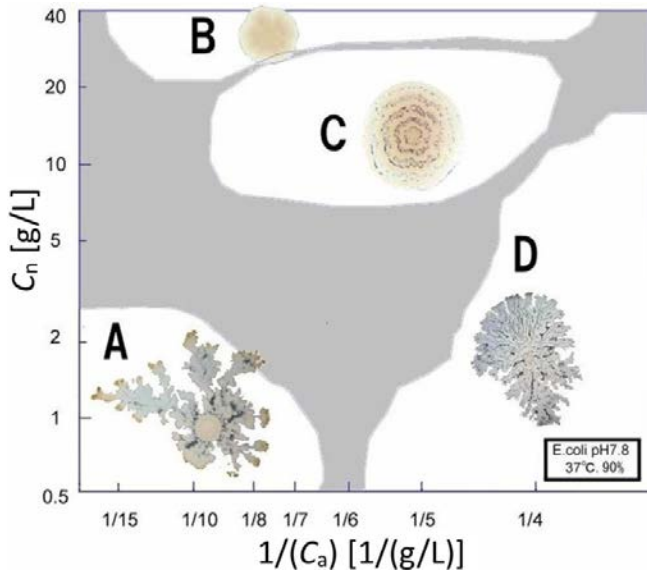


図 1.大腸菌コロニーのモルフォロジー・ダイアグラム

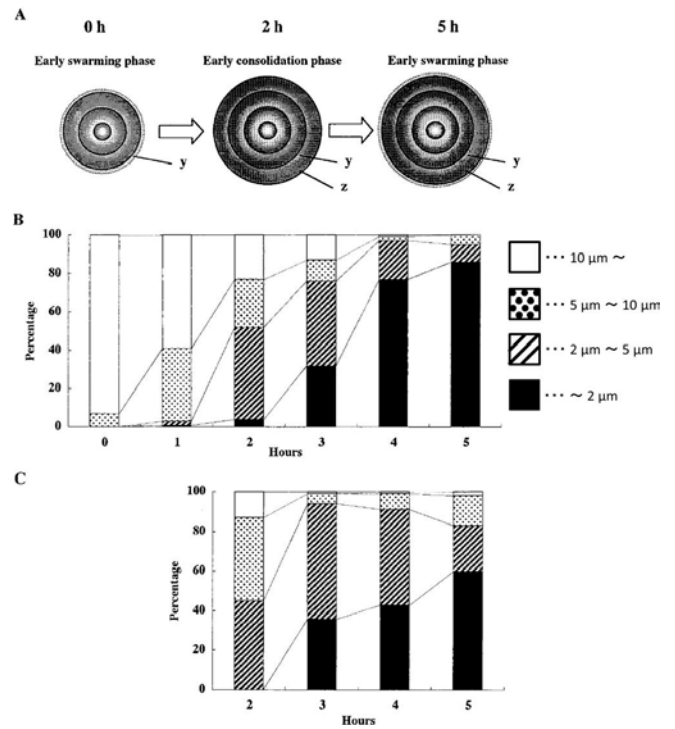


図 2. *P. mirabilis* の固定観測点における菌体長分布の時間変化

2. 目的

大腸菌の同心円状パターン形成要因を探るために、本研究では菌体長の分布に着目することとした。

- (1) 1st migration phase 開始時の初期菌集団を構成する菌の菌体長分布を調べる。
- (2) Lag phase における菌液接種点での菌体長分布を調べる。
- (3) 実験結果に基づく現象論モデルによる菌体長分布のシミュレーションを行い、実験結果と比較する。
- (4) 同心円状コロニー形成過程の第3周期と第4周期において、migration phase 開始時から consolidation phase 開始時 (migration phase 終了時)、consolidation phase 終了時までの1周期についてコロニー成長先端部の菌体長分布を調べ、*P. mirabilis* の同心円状パターン形成過程の場合と比較する。

3. 結果

3.1. 菌体長分布

同心円状パターン形成開始時である 1st migration phase 開始時における初期菌集団を構成する菌について、菌体長 L の確率密度分布をとった。図 3 はその分布と、対数正規分布関数と正規分布関数によるフィッティングを表す。分布の形はサイズの大きい方に裾がのび、対数正規分布関数によるフィッティングの方が正規分布関数によるものよりよく合っている。先行研究において、3rd migration phase 開始時における初期菌集団を構成する菌の面積分布が対数正規分布に従ったのと同様に、図 3 から 1st migration phase 開始時における初期菌集団を構成する菌の菌体長分布も対数正規分布に従うことが確認された。これより、同心円状パターン形成過程の他の migration phase 開始時においても同様に菌体長分布が対数正規分布に従うことが予想され、その背後には、何らかの乗算的な菌体長成長過程の存在が示唆される。

次に同心円状パターン形成開始前である Lag phase 中の菌液接種約 3 時間後の菌液接種点における、菌体長 L の確率密度分布をとった。図 4 はその分布と、対数正規分布関数と正規分布関数によるフィッティングを表す。図 3 と同様に、分布の形はサイズの大きい方に裾がのび、対数正規分布関数によるフィッティングの方が正規分布関数によるものよりよく合っている。図 4 から Lag phase における菌体長分布も対数正規分布に従うことが確認できた。これより Lag phase 中、菌体長の成長過程に何らかの乗算的過程が存在する可能性が予想される。

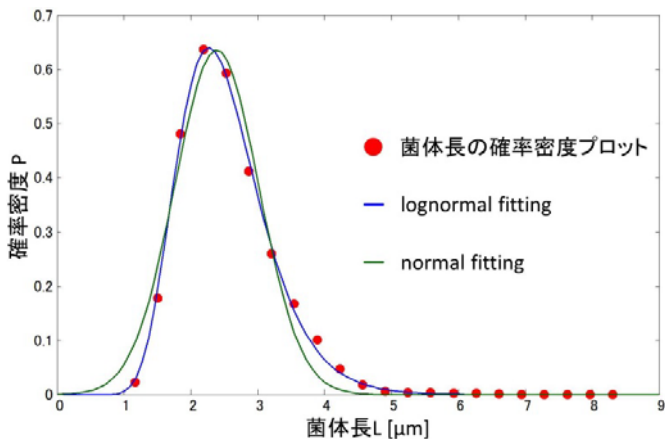


図 3. 1st migration phase 開始時における初期菌集団を構成する菌の菌体長 L の確率密度分布

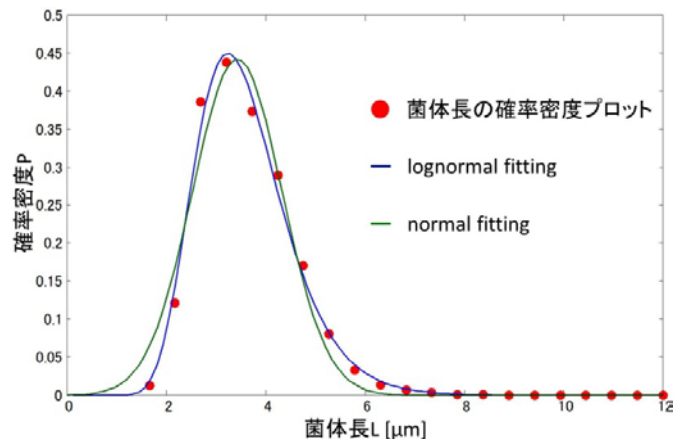


図 4. Lag phase における菌体長 L の確率密度分布

3.2. 現象論モデルとの比較

大腸菌も *B. subtilis* と同様に菌単体が成長と分裂を繰り返すことで増殖し、巨視的サイズのコロニーが形成される。そこで大腸菌の成長速度と分裂周期に焦点を当て、菌体長分布との関連を調べた。光学顕微鏡を用いて Lag phase における菌単体が成長する様子を観察したところ、菌体長が時間に対して線形的に成長することが確認できた。つまり、菌の成長が乗算過程的であることは否定された。さらに分裂周期の分布と成長速度の分布が、両方とも対数正規分布に従っていることが確認できた。ここで *B. subtilis* の先行研究で用いられた現象論モデルに、成長速度と分裂周期を実験で得られた対数正規分布関数を再現する乱数として与えて菌体長分布をシミュレーションした。図 5 は、菌体長分布の実験結果とシミュレーション結果の確率密度分布と、それぞれに対数正規分布関数によるフィッティングを行ったものである。2つのフィッティング曲線を比べると、ピークのの高さに多少の違いはあるが、ピークの位置などそれ以外の部分においては非常に一致している。これよりシミュレーションによって実験で得られた菌体長分布を、多少の差はあるがほぼ近似的に再現できることが確認できた。すなわち、菌の成長速度と分裂周期がともに対数正規分布に従うことが、菌体長分布が対数正規分布に従うことの要因となる可能性が確認された。

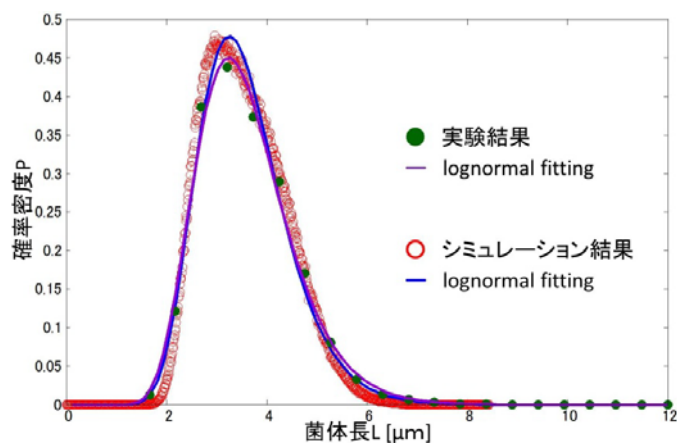


図 5. 実験結果とシミュレーション結果の比較 (菌体長確率密度分布)

3.3. 同心円状コロニー形成過程における菌体長分布の時間発展

図 6 は同心円状コロニー形成過程第 3 周期の各時点における菌体長の累積分布と、対数正規分布関数によるフィッティングを表し、図 7 は同心円状コロニー形成過程第 4 周期の各時点における菌体長の累積分布と、対数正規分布関数によるフィッティングを表す。各時点ともほとんどの部分でフィッティングとよく合っていることか

ら、それぞれの菌体長分布は対数正規分布に従うことが確認された。また菌体長分布が長い方から順に migration phase 開始時、consolidation phase 開始時、consolidation phase 終了時となっている。2つの図より、菌体長分布は3rd migration phase 開始時から3rd consolidation phase 終了時にかけて短くなり、4th migration phase 開始時に菌体長分布が長くなり、再び4th consolidation phase 終了時にかけて菌体長分布が短くなることから、同心円状コロニーの周期的成長のサイクルに同期して、菌体長分布も周期的に変動していることが分かった。

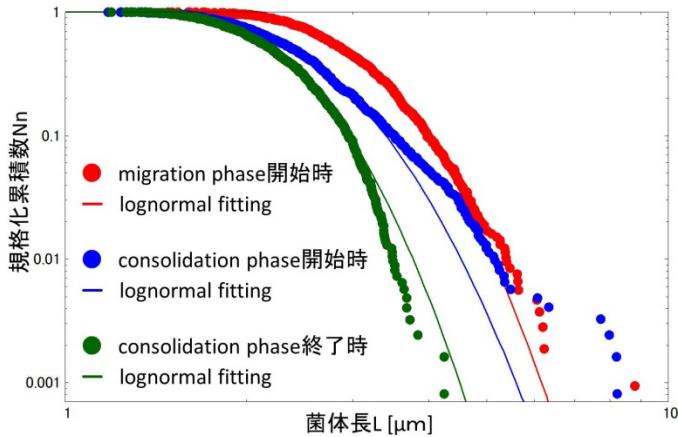


図 6. コロニー形成過程第 3 周期の時点別の菌体長累積分布

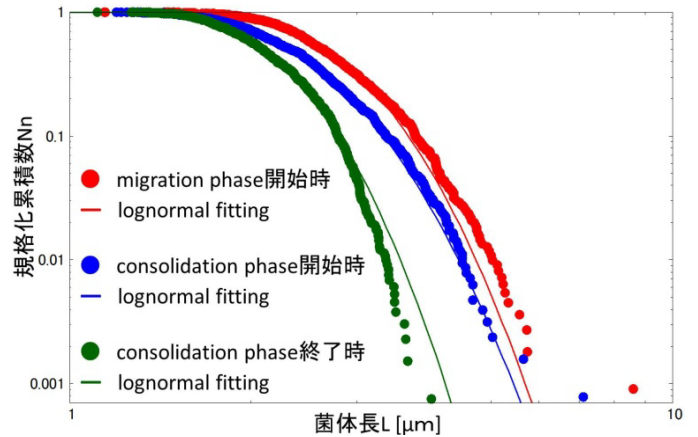


図 7. コロニー形成過程第 4 周期の時点別の菌体長累積分布

4. 考察

Lag phase において菌体長分布が対数正規分布に従うことと、現象論モデルを用いたシミュレーションで分布を近似的に再現できたことから、菌の分裂周期と成長速度の分布がともに対数正規分布に従うことが、菌体長分布が対数正規分布に従うことの要因であると考えられる。実験結果とシミュレーション結果の間に見られた若干の差に関しては、シミュレーションで用いた分裂周期と成長速度の分布が誤差を含んでいた可能性が考えられる。

同心円状コロニーの周期的成長に同期して、コロニー成長先端部の菌集団を構成する菌の菌体長分布も周期的に変動していることが分かった。この結果は、*P. mirabilis* の菌体長分布の時間変化の結果 (図 2) と一致している。大腸菌は *P. mirabilis* のように“分化—脱分化”は起こらないが、菌体長分布の変動的な振る舞いが似ていることから *P. mirabilis* と類似性があると考えられる。大腸菌の場合、菌体長が周期的に変動することから、その背後で菌単体の成長速度や分裂周期などが周期的に変動している可能性が示唆される。“分化—脱分化”のような大きな特徴的違いはないものの、菌の状態が何らかの環境の影響を受けて変動していることが考えられる。

参考文献

- [1] 時田理恵：大腸菌コロニーのパターン形成 (2007 年度修士論文)
- [2] 殿村幸彦：*Proteus mirabilis* の同心円状パターン (2009 年度修士論文)
- [3] 吉野哲雄：大腸菌コロニーの周期的成長パターン (2009 年度修士論文)
- [4] 杉山真也：大腸菌コロニーの周期的成長機構 (2013 年度修士論文)
- [5] T. Matsuyama, Y. Takagi, Y. Nakagawa, H. Itoh, J. Wakita and M. Matsushita: J. Bacteriol. 182 (2000) 385
- [6] J. Wakita, H. Shimada, H. Ito, T. Matsuyama and M. Matsushita: J. Phys. Soc. Jpn. 70 (2001) 911
- [7] R. Tokita, T. Katoh, Y. Maeda, J. Wakita, M. Sano, T. Matsuyama and M. Matsushita: J. Phys. Soc. Jpn. 78 (2009) 074005
- [8] J. Wakita, H. Kuninaka, T. Matsuyama and M. Matsushita: J. Phys. Soc. Jpn. 79 (2010) 094002