

Replica Printing for Concentric Ring-like Colonies of *Bacillus subtilis*

島田 宏俊, 脇田 順一, 伊藤 裕人, 渡辺 一彦, 松山 東平¹,
松下 貢

(H.Shimada, J.Wakita, H.Ito, K.Watanabe, T.Matsuyama¹, M.Matsushita)

中央大学理工学部物理学教室 ¹新潟大学医学部細菌学教室

(Department of Physics, Chuo University, Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8551)

(Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine, Niigata 951-8510)¹

序

私たちは、バクテリアが寒天培地表面上につくる、2 次元的パターンの形成を調べている。特に、*Bacillus subtilis*がつくるパターンのなかで、同心円状リングコロニーについて注目している。

このパターンは、コロニーが広がる migration、パターンの拡大が止まって増殖する consolidation が交互に周期的に起こることによって形成される。

今回の実験はこの周期成長のサイクルタイムが何によって決まるかを知りたいということから始めた。

実験

・使用した菌

B. subtilis 枯草菌とよばれる、納豆菌と非常に近い菌種である。

株は OG-01 株を使用。

細長い棒状で、周囲に鞭毛が生えており、これを使って水中を泳ぐことが出来る。また、環境条件が悪化すると芽胞と呼ばれる、一種の胞子の状態に成ることが出来る。

・実験方法

－培地の作り方

NaCl、K₂HPO₄ をそれぞれ 0.5% の水溶液をつくり、それに peptone(栄養)

と、Agar(寒天)を適量くわえて、オートクレーヴで滅菌し、固まる前に滅菌状態で内径 88mm の滅菌シャーレに 15cc ずつ分ける。室温で冷却し固化、乾燥機で約 1.5 時間乾燥する。

－菌液

緩衝液 PA10x に菌をとかし、OD が 0.5 になるように溶かす量を調節する。この菌液を、培地の中央に $3\mu\text{l}$ 接種する。

－培養条件

室温 35℃、湿度 90% の恒温恒湿機内で培養する。

・今までわかっていること [1]

寒天濃度と栄養濃度をパラメーターとして、変化させて実験をした結果、図 1 のような、morphological diagram がえられた。

この図は、横軸に寒天濃度の逆数を取っていて、右に行くほど寒天培地が柔らかくなる、つまり菌が培地上を運動しやすくなる。縦軸には、栄養濃度の対数をとっていて、上に行くほど栄養が多く、増殖しやすい条件である。

A、B、C、D、E、の 5 種類のパターンができることがわかっている。

A 領域にみられるのは、DLA-like なパターンである。フラクタル次元は、約 1.7 で、DLA モデルのフラクタル次元と一致する。また、遮蔽効果や反撥現象など、DLA モデルのシミュレーションで得られるのと同じ現象が実験でも得られたことから、DLA と考えて間違いはないだろうと思われる。

B 領域にみられるのは、Eden-like なパターンである。Eden モデルのクラスターに近いだろうと考えている。但し自己アフィン指数は 0.7 以上になり、Eden モデルの計算機シミュレーションで得られる値 0.5 より大きくなる特徴がある。

C 領域が、今回私が調べた同心円状のリングコロニーが出来る領域である。冒頭で述べたように、周期成長によって形成されるパターンである。

D 領域で見られるディスク状のパターンは、Fisher 方程式で説明できるパターンである。Fisher 方程式は集団に適応度の高い変位個体が出現した時、それが空間的に広がっていく過程を記述する集団遺伝学のモデルとして、Fisher が 37 年に提出した。成長界面の広がる速度や菌の密度など、実験結果は Fisher 方程式の解の振る舞いと矛盾しない。

E 領域には DBM-like なパターンが現れる。成長界面はきれいな円状なのだが、パターン内部は、細かく枝分かれしていて、枝の太さと枝と枝の間隔がほぼ 1 対 1 であるという特徴がある。

C 領域のような同心円状のパターンは、*B. subtilis* 以外に、ビタミン C などの

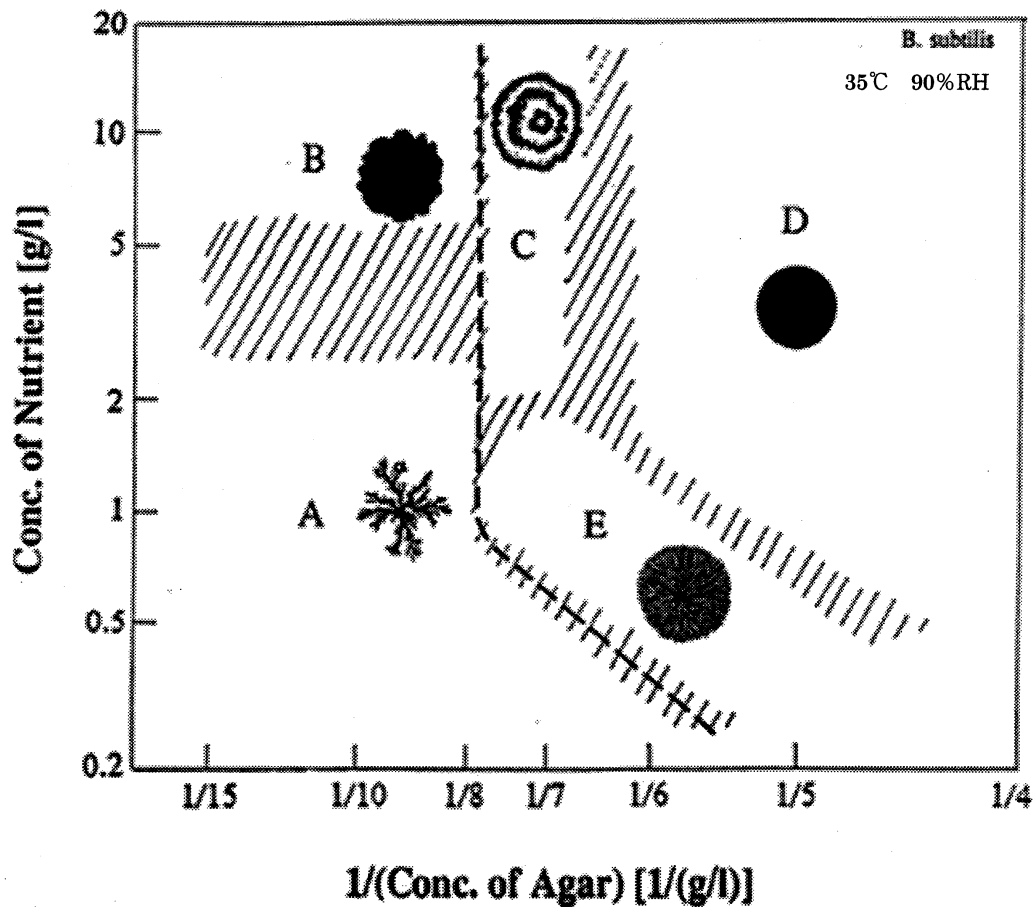


図 1

Morphological Diagram of Bacterial Colonies for *Bacillus subtilis*

横軸は寒天濃度の逆数、縦軸は栄養濃度の対数をとっている。右に行くほど菌の易動度が高く、上に行くほど増殖しやすい環境になっている。

5種類のパターンが得られて、A、B、C、D、E領域と名前をつけている。斜線部分はそれらの中間的パターンの領域で、上下に走る破線は能動的運動を行って出来るパターンとそうでないパターンの境界線である。

これを見てすぐ分かるように、C領域のリングパターンは寒天濃度に対して非常にせまい領域でしかあらわれない。

結晶成長や、同じバクテリアでは、*P. mirabilis*などが知られている。

・レプリカプリンティング[2] [3]

今までの実験で、一回の migration の続く時間、consolidation の続く時間、それらを足した一つのリングが出来のにかかる時間 (cycle time) とリング一つの幅の寒天濃度依存性、栄養濃度依存性を調べた実験がある。その結果は、cycle time は寒天濃度にも栄養濃度にも依存しないで一定であった (グラフ 1、2)。この結果は、コロニーの周期成長のリズムは菌内部のプログラムによるのではないかということに連想させる。しかしそれでは生物学の問題になってしまうので、物理の問題にならない。それについて調べるためにレプリカプリンティングという実験を行った。

レプリカプリンティングは、簡単に言うとコロニーの移植である。

ある程度成長したコロニーを寒天培地ごとメスで切り取り、それを台の上に乗せて、新しい新鮮な培地を上からかぶせるようにして、新しい培地に菌だけはりつける (図 2)。

こうして、切り取られた方のコロニーの成長サイクルと貼り付けられたコロニーの成長サイクルを比べる。もしサイクルがずれるようなことがあれば、菌自身のプログラム説は否定されることになる。

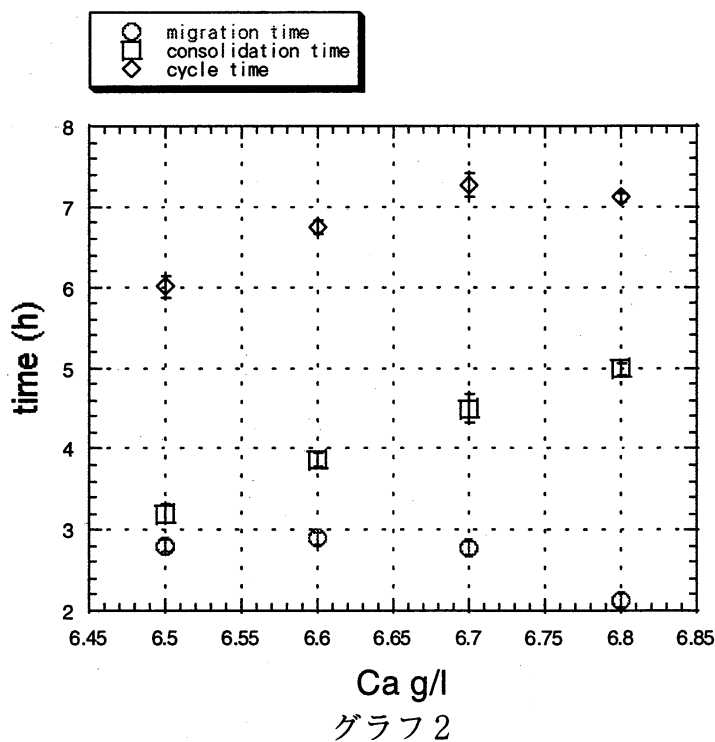
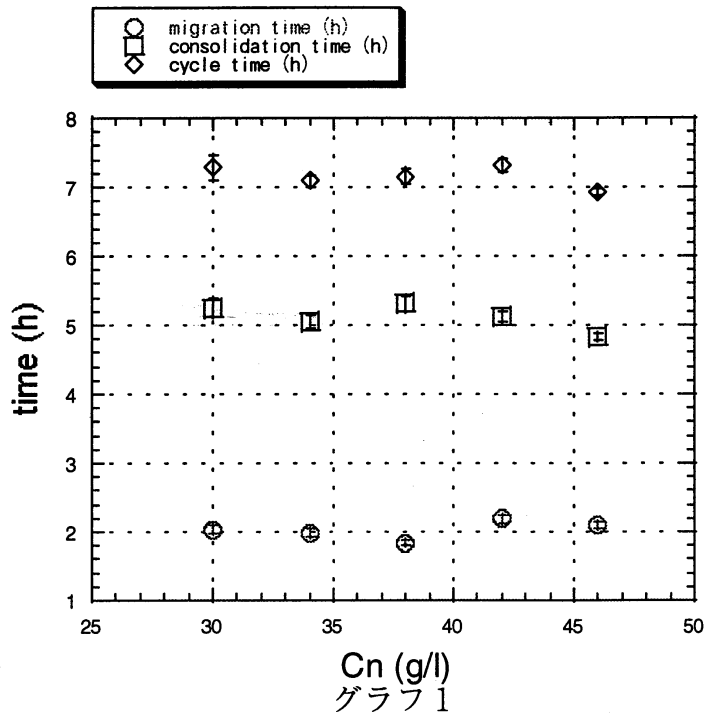
実験結果

・マイグレーション中のコロニーのレプリカプリンティング

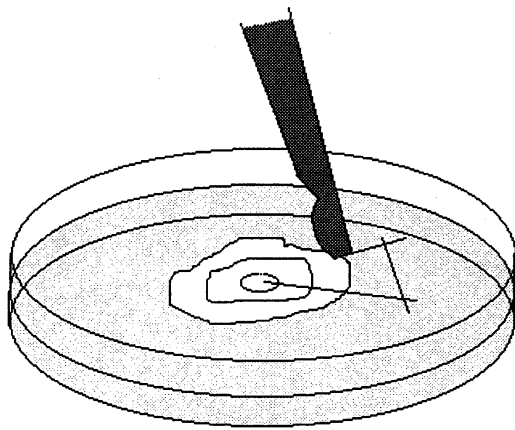
結果から言うと、マイグレーション中のコロニーをレプリカプリントしてもそのままマイグレーションを続ける。ただし、レプリカプリントされたほうのコロニーが新しい培地で広がった部分は、元のコロニーのフロント部分が中心でなく、外側から 2 番目のリングのフロント部分が中心に広がっているように見える (写真 1)。

顕微鏡で観察してみると、マイグレーション中だった一番外側のテラスの菌はレプリカプリントされるとまばらになりまったく動かず(写真 2)、その代わり、一つ内側のテラスの先端から活発な菌が湧き出しているのがみえた。

そこで、切り方を変えてレプリカプリンティングを行った。まずひとつは、一番外側のテラスだけを切り取る方法。もうひとつは、外側から 2 番目のテラスの先端部分までを切り取る方法である (図 3)。前者では、レプリカプリンティング後はマイグレーションが続かなかったのに対し、後者は、そのままマイ



多少左下がりだが、中心からの方向によってサイクルタイムには、多少の誤差があるので、ほぼ一定とみなした。



サンプル A↑

サンプル B↓

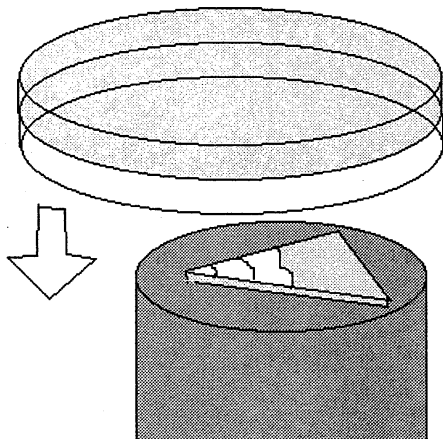
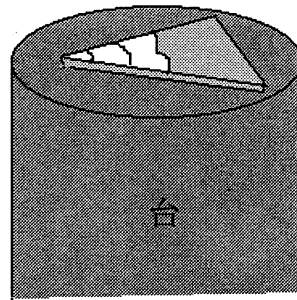
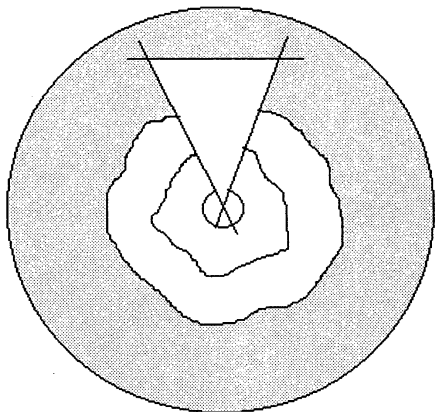


図 2

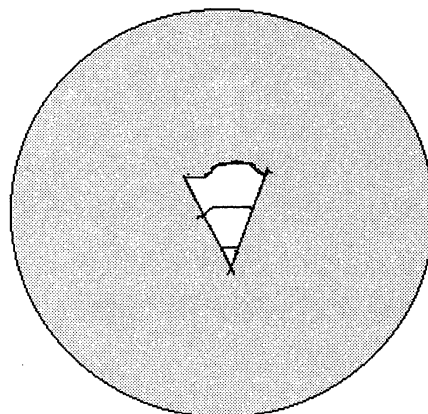
レプリカプリンティング

ある程度成長したコロニーを、メスで培地ごと切り取りそれを台の上に乗せる。その上から新しい新鮮な培地をかぶせるようにして、菌だけ新しい培地にはりつける。

切り取られた元のコロニーと、貼り付けられた新しいコロニーの成長サイクルを比較する。

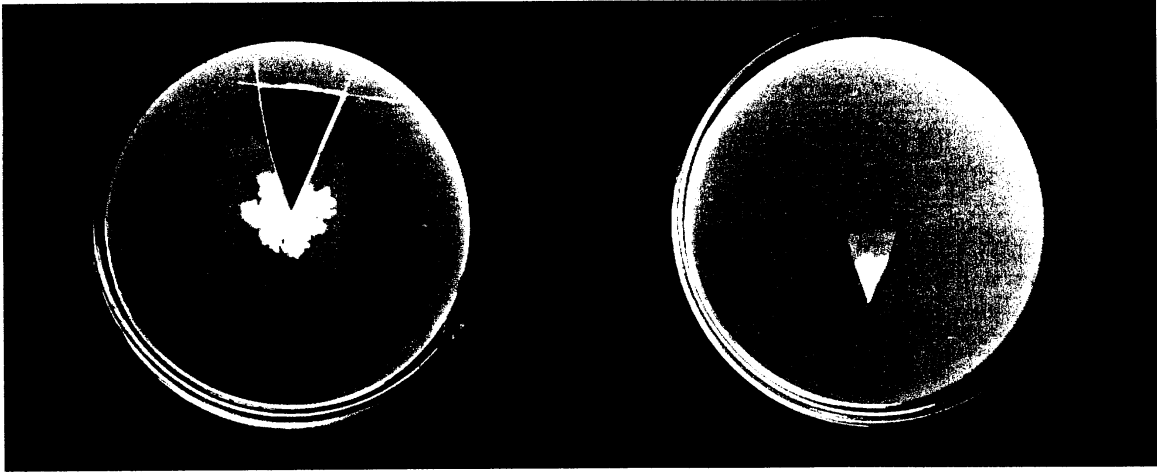


サンプル A↑

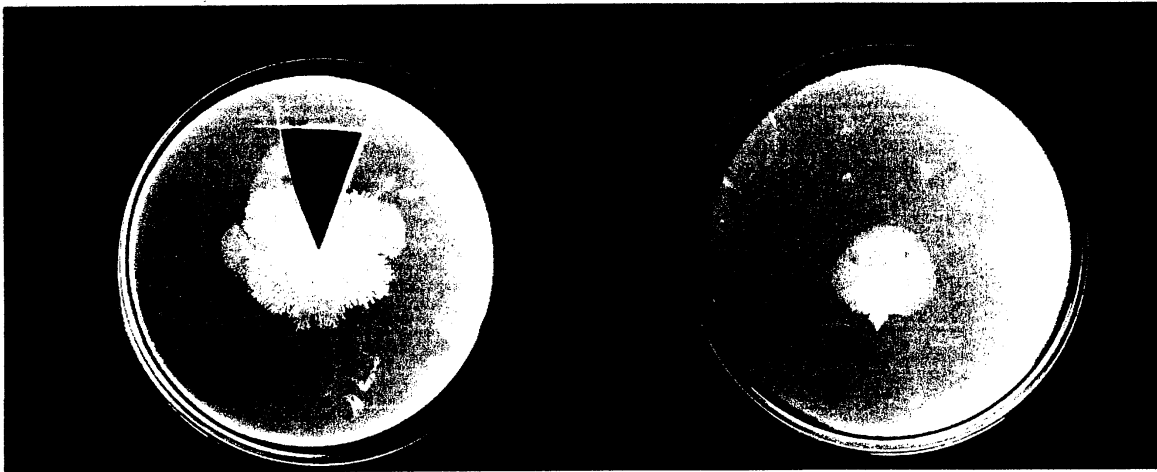


サンプル B↑

マイグレーション中のレプリカプリンティング



レプリカプリント直後



レプリカプリント1時間後

写真1

マイグレーション中のコロニーをレプリカプリンティングした実験。マイグレーションは、そのまま続いているのが分かる。しかし新しく広がったリングは、もともとの成長先端ではなく、一つ内側のリングの先端を中心に広がっているように見える。(写真中の黒い点が、元の成長先端に印をつけたもの)。

マイグレーション中のレプリカプリンティング
顕微鏡写真

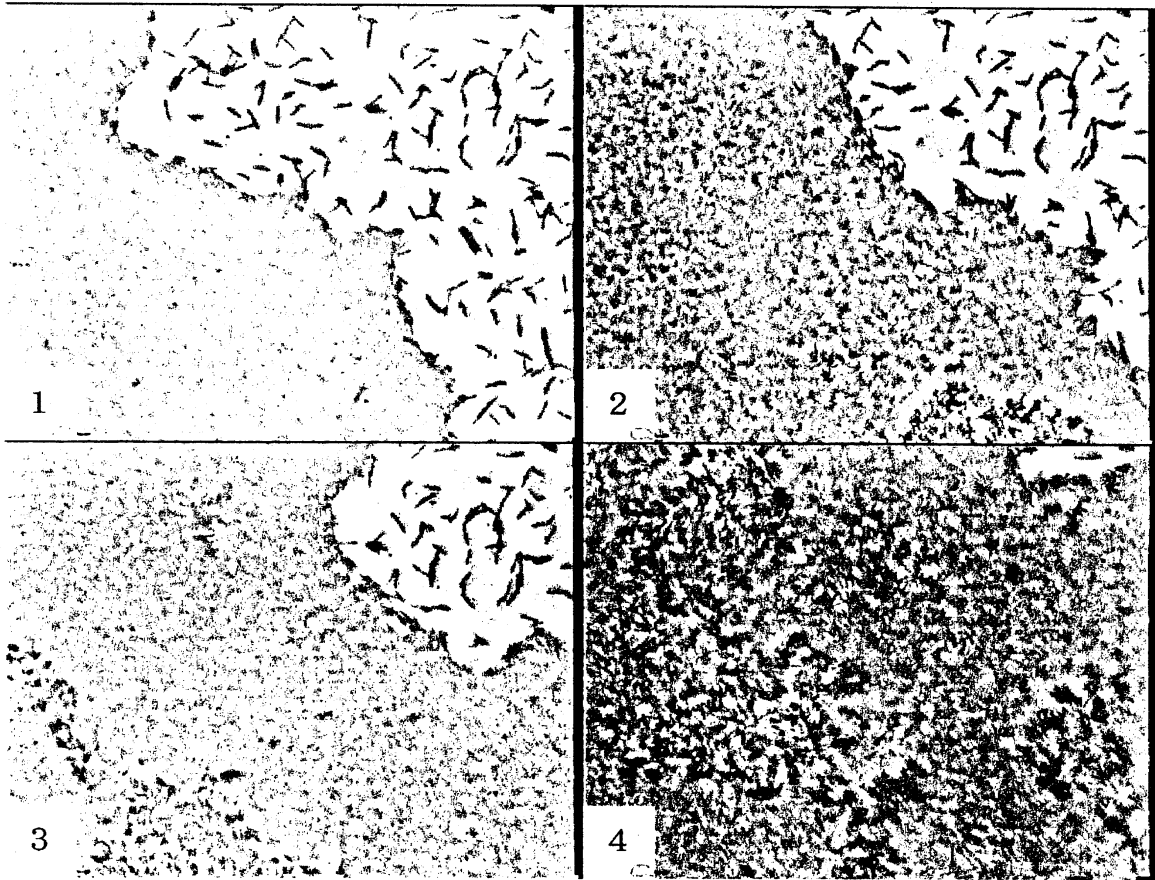
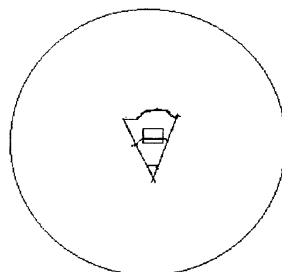
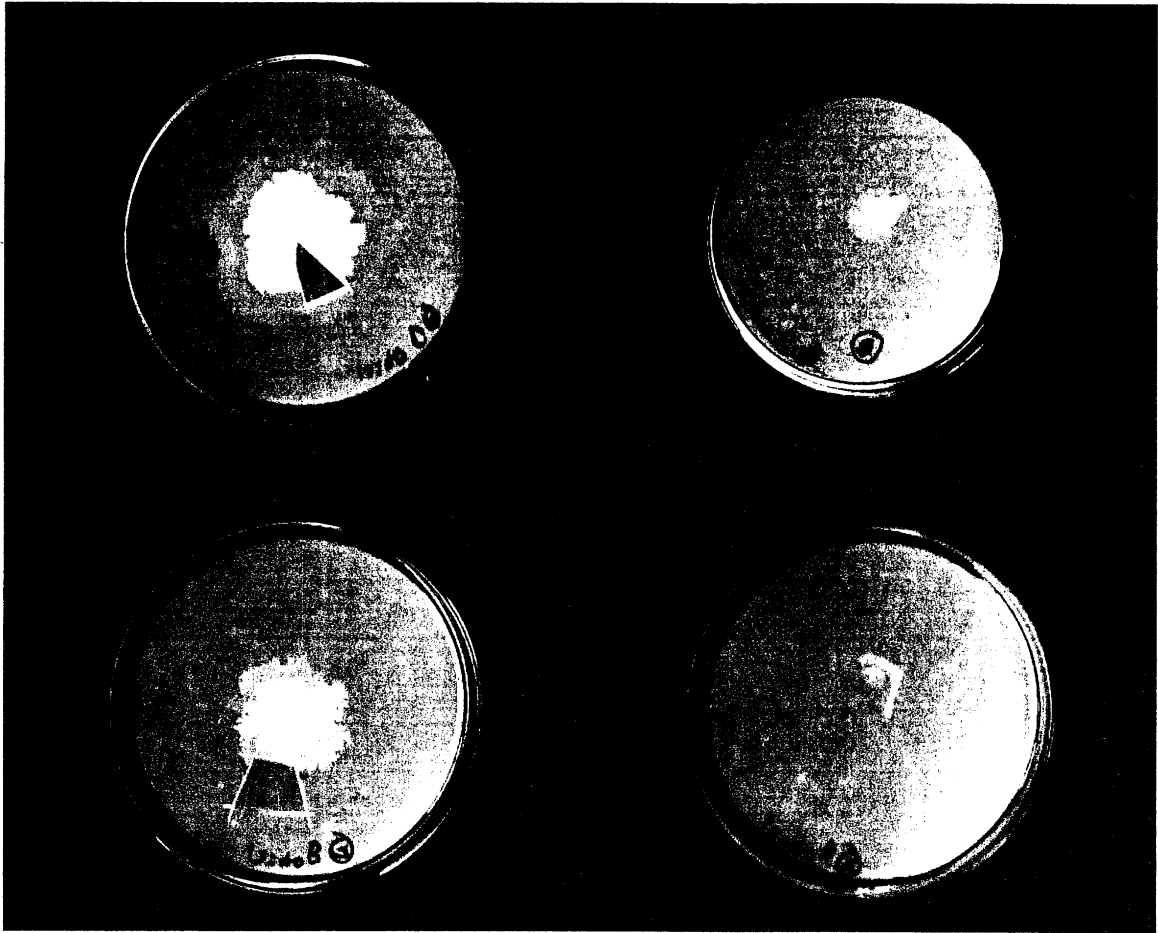


写真2

レプリカプリントしたコロニーの一番外側のリングと、一つ内側のリングの境目付近（下図の網掛け部）の顕微鏡写真。右上のまばらで動かない菌が見える部分が外側のリングで、左下の密に見える部分が一つ内側のリングから湧き出してきた菌。湧き出してきた菌がまばらな菌を覆っていく様子がわかる。



マイグレーション中のレプリカプリンティング



レプリカプリンティングから 1 時間後

写真 3

上の二つの写真は図 3 の左のように切った実験。下の二つの写真は図 3 の右のように切った実験。上の写真ではマイグレーションが続いているが、下の写真はマイグレーションが続いていないことが分かる。

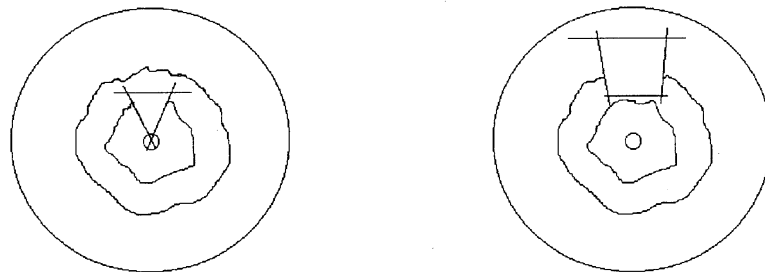


図 3

左が一つ内側のリングまで、右が一番そと側のリングだけ切った例

グレーションが続いた (写真3)。

このことから、マイグレーション中のコロニーは、外側から2番目のテラスの先端から、菌が次々に供給されてマイグレーションが続いていることが分かった。しかし、一番外側のテラスの菌はレプリカプリンティングによって密度が下がり動けなくなってしまうので、その一番外側のテラスの振る舞いは良く調べられなかった。

・コンソリデーション中のコロニーのレプリカプリンティング

コンソリデーション中のレプリカプリンティングの実験は、コンソリデーションが始まってから、レプリカプリンティングするまでの時間によって結果が少しずつ変わってきた。

まず、コンソリデーション開始直後の実験では、レプリカプリンティングされたコロニーの側面の、一番外側のテラスの一番後方 (成長方向を向いて) 部分からプリント直後にマイグレーションが開始された。さらにフロント部分からも元のコロニーより早くマイグレーションが始まった (写真4)。

コンソリデーション開始1時間経過後の実験でも同様に、側面からマイグレーションが開始するが、開始直後の場合より始まる場所がすこしフロント方向にずれている。さらに広がった後の写真を見ても一番外側のテラスの真中あたりを中心に広がっているように見える (写真5)。

コンソリデーション開始2時間後の実験では、更にフロントに近いところからマイグレーションが開始している。広がった後の写真もテラスの前方部分を中心に広がっているように見える (写真6)。

コンソリデーション開始から3時間半後はマイグレーション開始直前で、このときはフロント部分からしかマイグレーションは起こらなかった (写真7)。

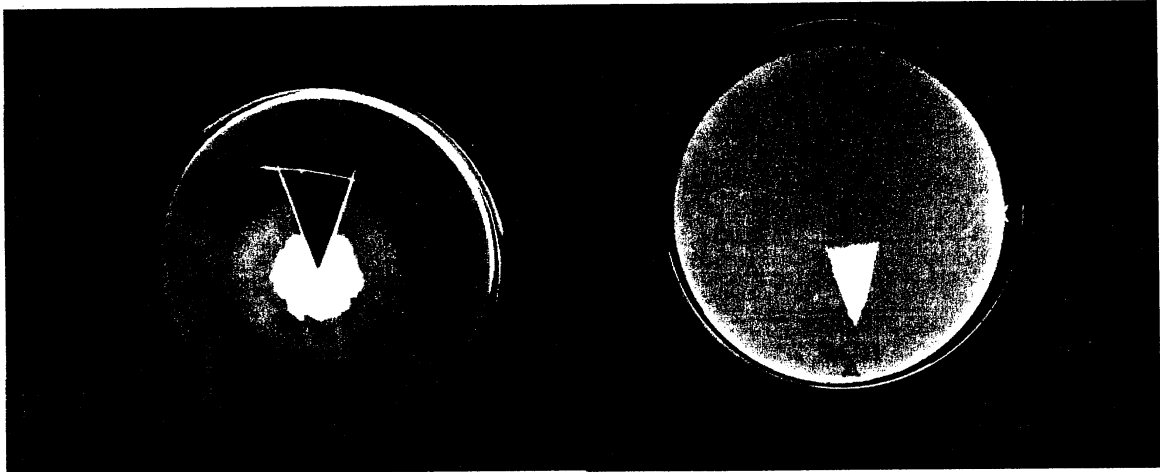
また、マイグレーション中の実験でやったように一番外側のテラスのみを切り取った実験を行った。その結果、コンソリデーション初期の実験では後方部分から、コンソリデーション末期の実験では前方からマイグレーションが開始された。さらに、初期の実験では時間をおいて前方からもマイグレーションが開始した。そしてその時間差がそのまま続いてコロニーが成長していった (写真8)。

まとめ

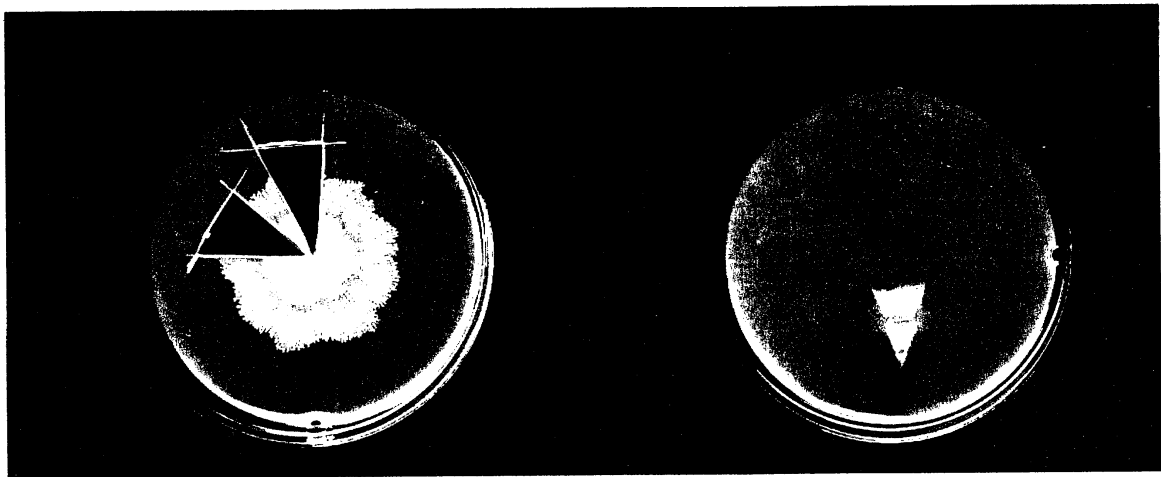
以上の実験からまとめると

- ・周期成長は、レプリカプリントによって培地が変わることで影響を受ける。
- ・マイグレーション中の実験では、レプリカプリントにより外側のテラスの菌が活動できなくなった。

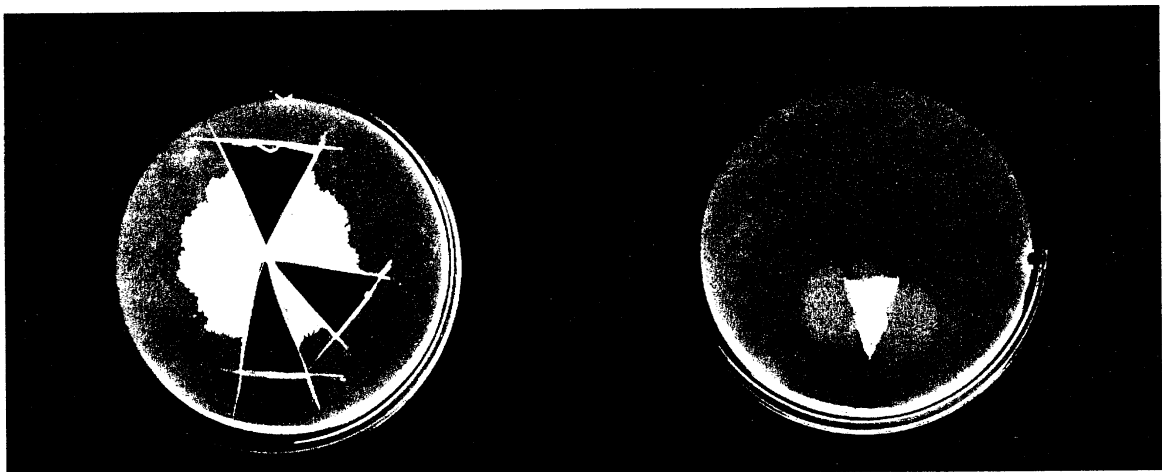
コンソリデーション開始直後のレプリカプリンティング



コンソリデーション開始直後



コンソリデーション開始 1 時間経過

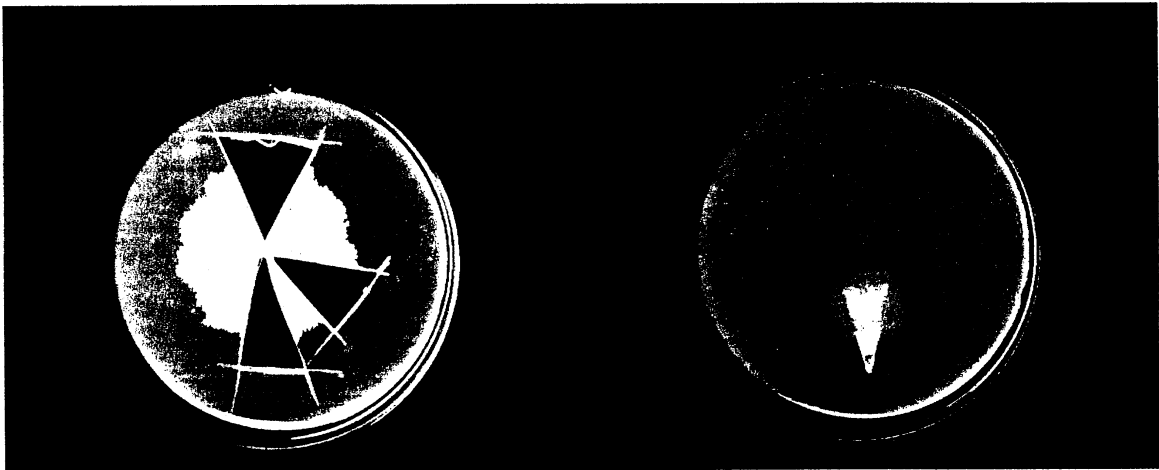


コンソリデーション開始 2 時間経過

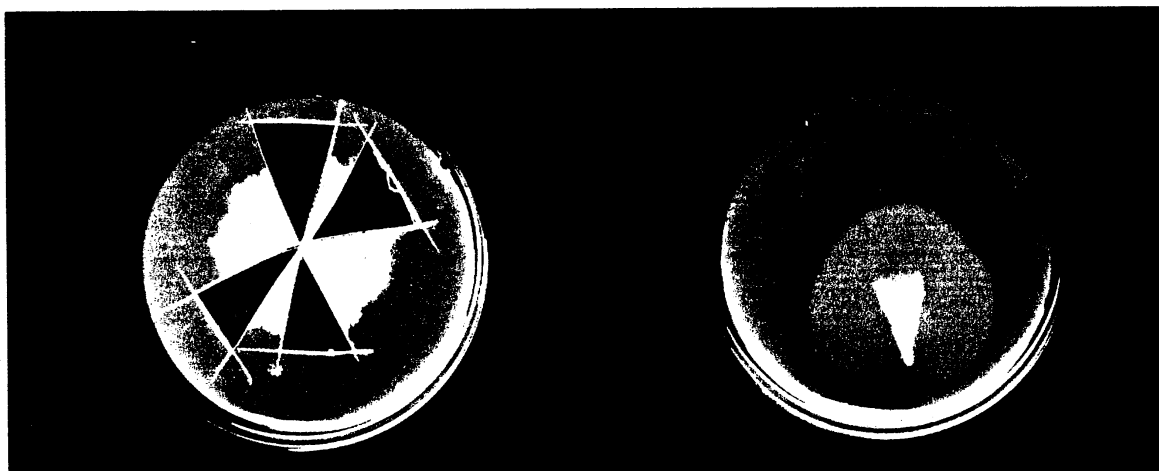
コンソリデーション開始から1時間後のレプリカプリンティング



コンソリデーション開始1時間経過

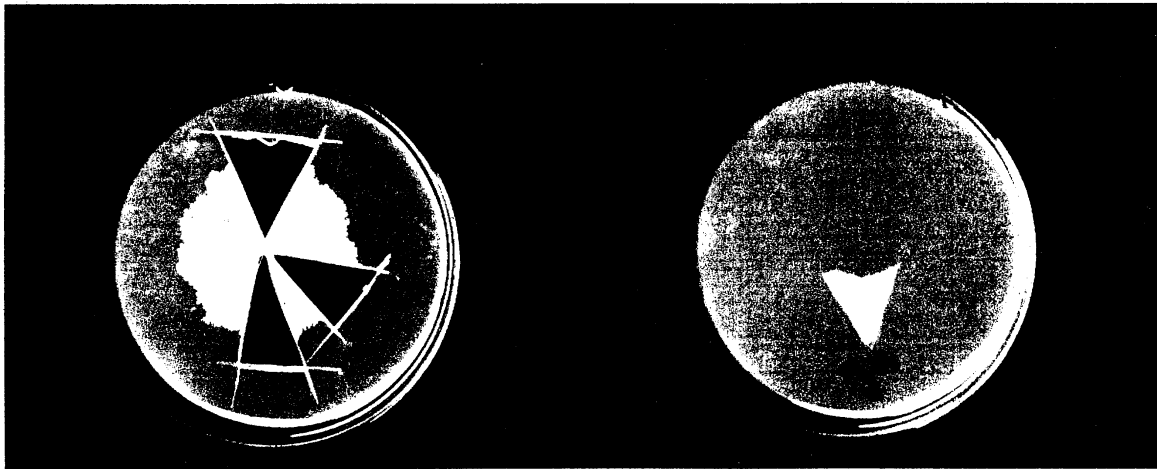


コンソリデーション開始2時間経過

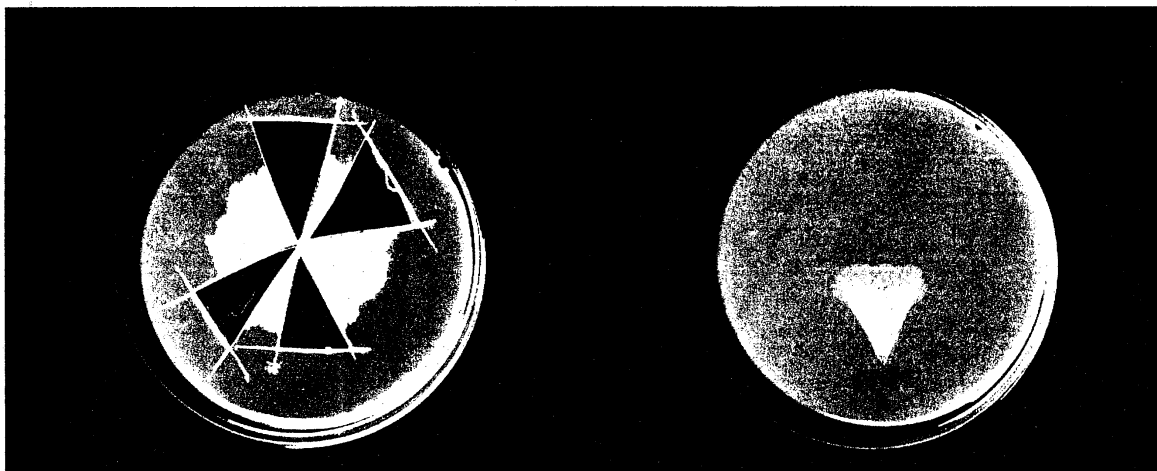


コンソリデーション開始3時間半経過

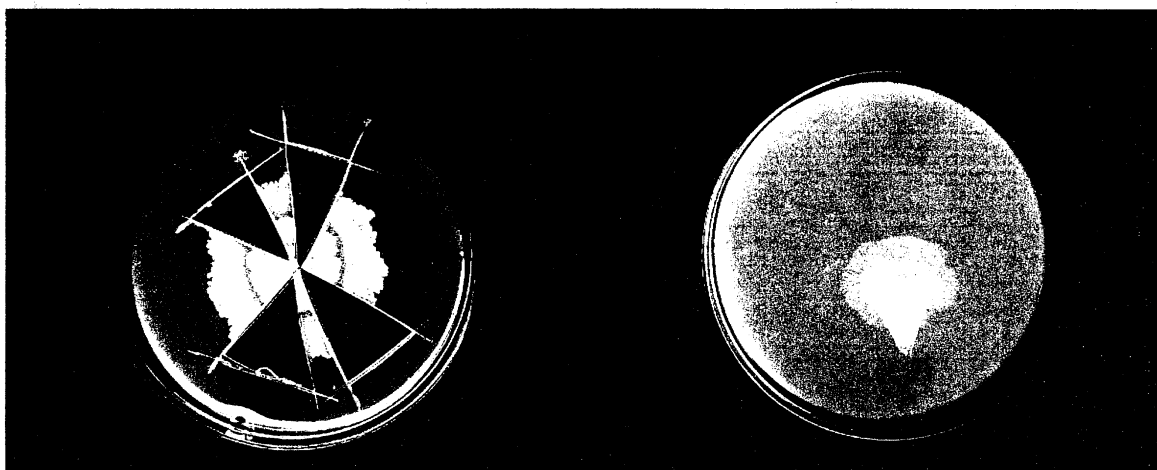
コンソリデーション開始から2時間後のレプリカプリンティング



コンソリデーション開始2時間経過



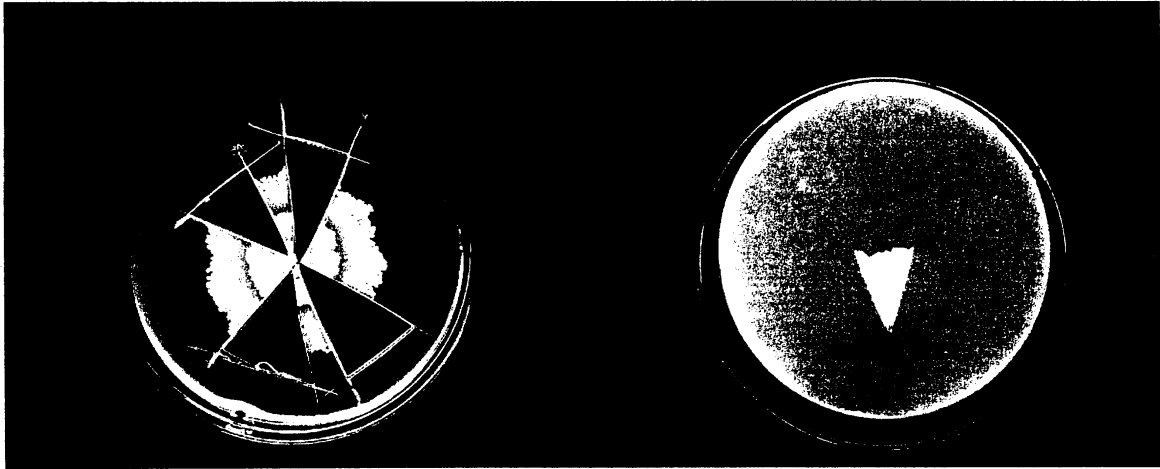
コンソリデーション開始3時間半経過



マイグレーション開始1時間経過

写真6

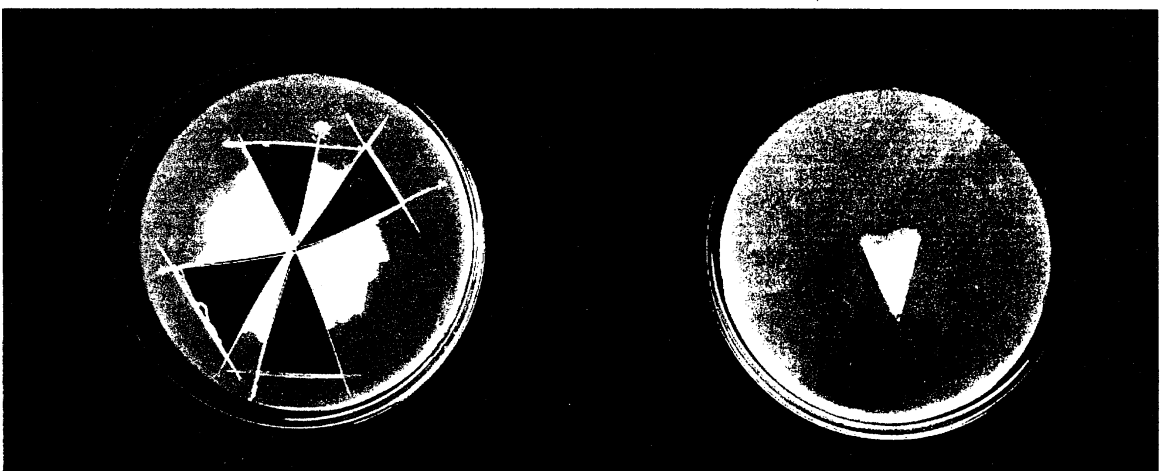
コンソリデーション開始から3時間半後のレプリカプリンティング



コンソリデーション開始3時間半経過



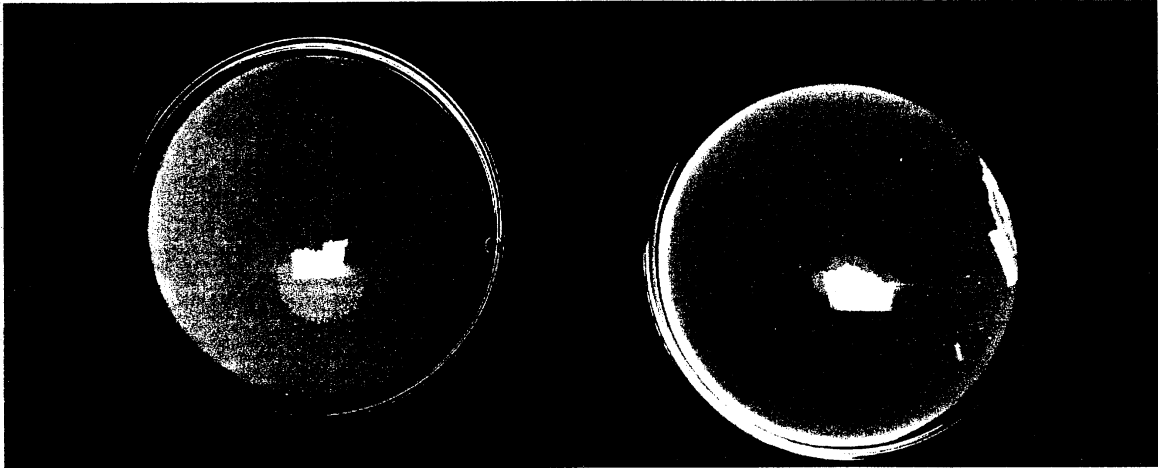
マイグレーション開始1時間経過



マイグレーション開始2時間経過

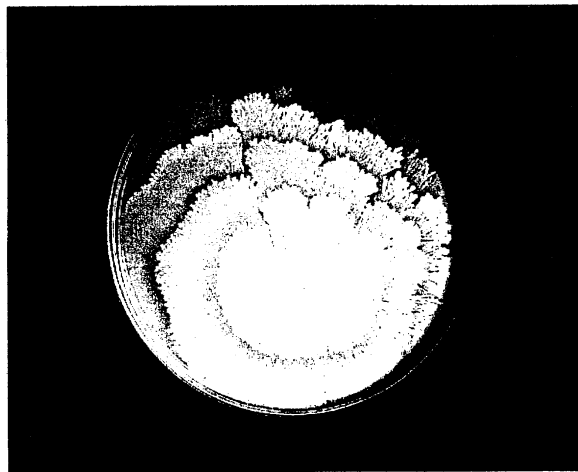
コンソリデーション中のレプリカプリンティング

レプリカプリント 1 時間後



コンソリデーション開始直後の実験

コンソリデーション終了直前の実験



コンソリデーション開始直後の実験その後

写真 8

プリントするもとのコロニーは図 3 の右のように切った。この写真では元のコロニーでフロントだった部分は上を向いている。上の左の写真は、コンソリデーション初期の実験である。フロントと逆の方からマイグレーションが始まっている。上の右の写真はコンソリデーション後期で、フロントからしかマイグレーションが始まらなかった。下の写真は、コンソリデーション初期の実験で、約 1 日後の写真である。後方からマイグレーションが始まったのち、時間差をおいてフロントからもマイグレーションが始まった。そして、ずれがそのままにリングパターンが成長している。

- ・コンソリデーション中の実験では、カットした側面部分からレプリカプリンティング直後にマイグレーションが始まる。
- ・フロント部分についても、元のコロニーより早くマイグレーションが開始するが、直ちに開始するような大きな影響ではない。

これらの結果から考察されることは、コンソリデーション中コロニーの一番外側のテラスにはレプリカプリンティングされることによって直ちにマイグレーションを開始できる部分がある。この部分は始めテラスの一番後方にあるが、時間と共に前方へ移動していき、フロント部分に達した時マイグレーションが開始される（図4）。いいかえると、テラス内部に構造がありそれが時間的に変化していき、ある構造になるとマイグレーションが開始されるということである。

今後、この構造をミクロな視点で観察することが重要である。

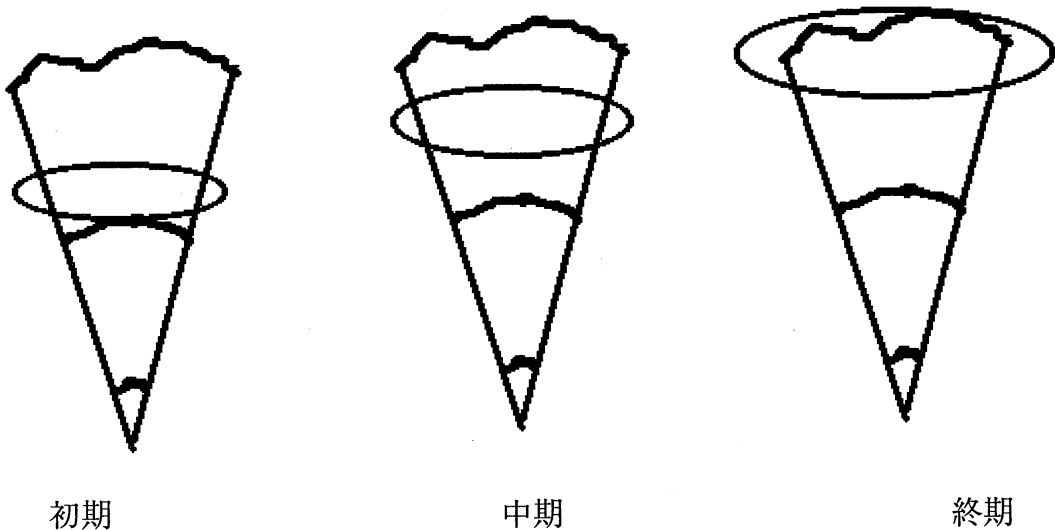


図4

まるで囲んだ部分がすぐにマイグレーションを開始できる部分。時間と共にフロント部分へ移動していく。

参考文献

[1] M. Ohgiwari, M. Matsushita and T. Matsuyama: *J. Phys. Soc. Jpn.* **61** (1992) 816.

[2] J. Wakita, H. Shimada, H. Ito, T. Matsuyama, and M. Matsushita: submitted to *J. Phys. Soc. Jpn.*

[3] T. Matsuyama, Y. Takagi, Y. Nkagawa, H. Ito, J. Wakita, and M. Matsusita: *J. Bacteriol.* **182** (2000) 385.