

大腸菌パターンにおける伝搬パルス*

宮崎大学・工学教育研究部 辻川 亨

Tohru Tsujikawa

Faculty of Engineering, University of Miyazaki

e-mail: tsujikawa@cc.miyazaki-u.ac.jp

1 導入

ある種の微生物は、鞭毛のような微視的な大きさの高性能な遊泳器官により動いている。たとえば、大腸菌には、運動性 [1] の能力があって、寒天上に非常に美しい自己組織化されたパターン [2]、[3] を作る。本報告では個々の細胞の運動性による微視的な振る舞いと集合パターンのような巨視的な自己組織化された秩序における構造の解明に焦点を当てる。図 1 は、2 種類の異なる硬さの寒天上での大腸菌のコロニーパターンを示している。より硬い寒天 (0.5 % 以上) 上で中央部に菌を接種したとき、コロニーは寒天上を成長して、図 1(a) のようなイーデンパターン [5] に似たものを形成する。このようなパターンは枯草菌 [6]、[7] のコロニーの共同成長パターンと類似しており、成長 (反応) と拡散のメカニズムにより説明されている [8]、[9]、[10]。一方、柔らかい寒天 (0.5 % 以下) のとき、大腸菌は寒天内に入り、鞭毛を用いて遊泳することができる。それにより大腸菌が自己推進生物のように振る舞い、図 1 (b)-(d) で示すような複雑なパターンを作る。このパターン形成のメカニズムの詳細は、第 2 章で述べる。

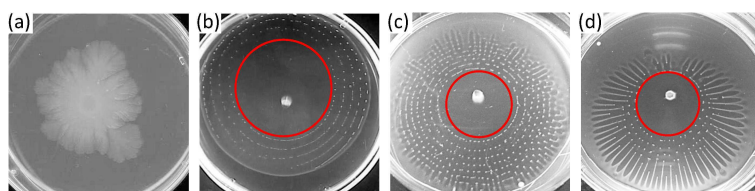


図 1: 野生株大腸菌 (RP437) による空間コロニーパターン. グレイスケールは、細胞密度を示す. (a) 1.0 % の硬い寒天上のイーデン・パターン. (b)-(d) 0.2 % の寒天上のセンターリング、初期栄養 (コハク酸塩) 濃度 (b) 2mM; (c) 3mM; (d) 4mM.

大腸菌の運動性について、細胞はおよそ 0.8 s の間まっすぐに遊泳し、それからランダムに方向を変えて、0.8 s の間また遊泳する [11]、[12]。図 2 において、(a) は 1 つの細胞がランダムな移動を、(b) は異なる環境条件および初期栄養濃度の下での平均二乗変位量 (MSD) を示した。MSD の図から巨視的なパラメータとして、細胞の実効拡散係数を推定することができる。一方、大腸菌の他の特徴である走化性とは、菌が走化性レセプターによって化学誘引物質を感じ、細胞が誘引物質の濃度勾配が上昇するとき、運動時間はより長くなる。一方、濃度勾配が下降するとき、それはより短くなるか、変わらない。従って、大腸菌は平均して走化性物質の濃度のより高い領域へ進むことになる [11]、[13]、[14]、[15]。

*櫻井建成、梅野太輔 (千葉大学) との共同研究に基づく。

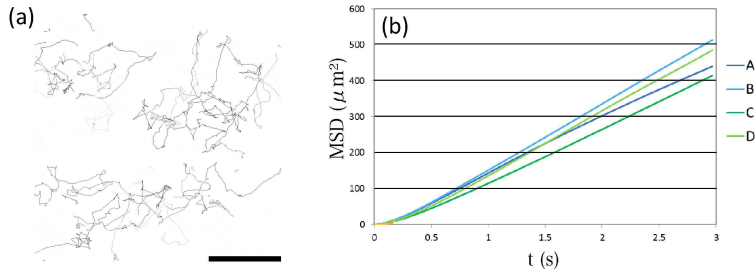


図 2: 大腸菌の運動性. (a) 0.2 % の寒天上を移動する大腸菌の軌道. 尺度バーは $50\mu\text{m}$. (b) 異なる条件下での平均二乗変位量 (MSD). A, B は野生株 (RP437) そして C, D はアスパラギン酸塩に対する走化性レセプターを取り除いた株 (RP5869). A, C が初期濃度 2mM のコハク酸塩, B, D は 10mM のコハク酸塩に対応する. すべての線は同様の傾向を示している. また, 異なる初期栄養濃度に対して, 実効拡散係数はほとんど同じである.

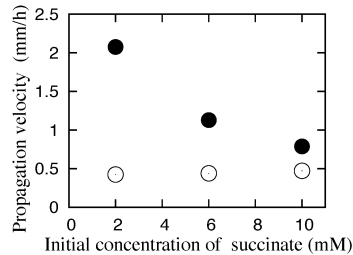


図 3: ●は野生株 (RP437) の伝播パルスの速度、○は非走化性株 (RP5869) のコロニー前面の速度

図 3 は、アスパラギン酸塩に対する走化性レセプターをもつ野生株 (RP437) の伝播パルスと、レセプターを持たない非走化性細胞 (RP5869) のコロニーの前面の速度を示した。図 2(b) で示されるように、実効拡散係数が両方とも初期栄養濃度に依存しないとしても、走化性細胞の伝播速度は非走化性細胞のそれよりも早く、そして初期栄養濃度に比例して減少する。これらの特徴は、成長 (反応) - 拡散系において自明ではない [5], [6]。さらに、ある条件の下で、大腸菌は化学物質 (アスパラギン酸塩など) を自身が排出することによって、走化性誘引の集中場を作る。図 1 (b)-(d) で示す大腸菌の自己組織化パターンは自身が作る走化性誘引物質の濃度場とそれを感じる走化性の特徴により作られる。いくつかのモデルが、パターン形成のメカニズムを理解するために提案されている。その 1 つが成長 (反応) - 拡散-走化性モデルである [16], [17], [18], [19], [20]。これらのモデルによる数値計算結果は、実験結果で得られたコロニーパターンと非常に類似している。しかし、伝播パルスの速さと初期栄養濃度との関係を十分に再現していない (図 3)。我々はこれらの問題を解決するために、モデルの修正を試みている。この報告では、我々の最近の結果を含む、Budrene と Berg [2], [3] による実験結果である大腸菌の自己組織化されたパターンをまとめ、形成メカニズムを理解するために新たに成長-拡散-走化性機構を用いたモデルを提案する。また、その数値計算結果と実験結果を比較することで、自己組織化されたパターンの形成メカニズムを明らかにする。

2 大腸菌のパターン形成

この章では、Budrene と Berg [2]、[3] による既知の実験の追試を含めた我々の実験結果を示す。図 1 より、コハク酸塩の濃度のある範囲で様々な空間パターンが現れることを示した。栄養であるコハク酸塩の初期濃度のより低い、またはより高い条件下で現れる細胞のより高い密度に対応する円形パターン（群れリングと呼ばれる）は、図 4 で示した。それは、6mM のコハク酸塩を用いて 0.2 % の寒天媒質の中央に接種された菌が時間と共に広がっていく。菌の密度はパルスの前面で急速に増加し、そして後部でゆっくりと減少していく（図 4 (d)-(f)）。また、40 時間後まで、速度はほぼ一定である（図 4(g)）。

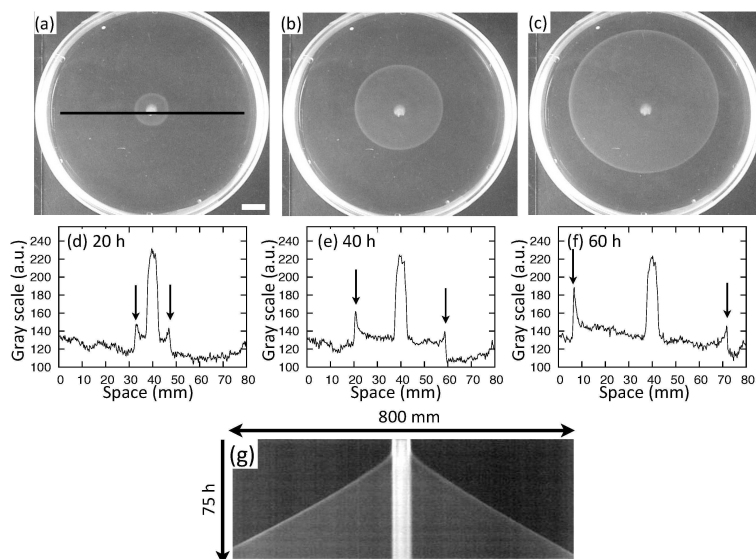


図 4: 初期濃度が 6mM のコハク酸塩について、0.2 % の寒天での群れリングと呼ばれる、伝播するパルス。(a, d), (b, e), (d, f) は菌を接種後の 20 時間、40 時間と 60 時間後の実験結果である。(d)-(f) は (a) の黒い線に沿った透過光の強さである。矢印の位置は、伝播パルスの前面を示している。(g) は (a) の黒い線に沿った伝播パルスの前面の位置の空間-時間に関する図である。

円形伝播パルスは寒天 0.2 % で初期栄養濃度が 2mM の条件で出現する（図 1 (b)）。その速度は図 5 の中で示される 30 時間後に一定となる。図 6 は図 5 (c) の右中央部の拡大図である。この条件下で細胞は伝播する高密度なリングの中で集合し、パルスの後部に複数のドットが生成される。このドットは活発な運動性のある細胞を含むので [2]、その後すぐに動きだす。しかし、パルスの後部では栄養濃度が減少しているため、しばらくして細胞は泳ぐ能力を失う。このように、ドット内の細胞は非運動性（不活性）へと変化するので、ドットは位置を変えなくなる。したがって、不活性細胞による美しい定常パターンが出現する（図 1 (b)-(d)）。

図 7 はパターンの特徴を理解するために、0.24 % の寒天培地でコハク酸塩の初期濃度に依存した、伝播パルスの速度と、ドットがはじめて現れる中心からの距離についての実験結果である。栄養の初期濃度が 2mM と 5mM の近くを境に、ドットをもつものと持たない伝播パルスの存在領域が分かれる。また、栄養の初期濃度が低い場合、速度は増加、高い場合は減少傾向にある。コハク酸塩の初期濃度が 2mM と 5mM の間にあるとき、初めてドットが現れる中心からの距離は初期濃度が増加するとき減少する。

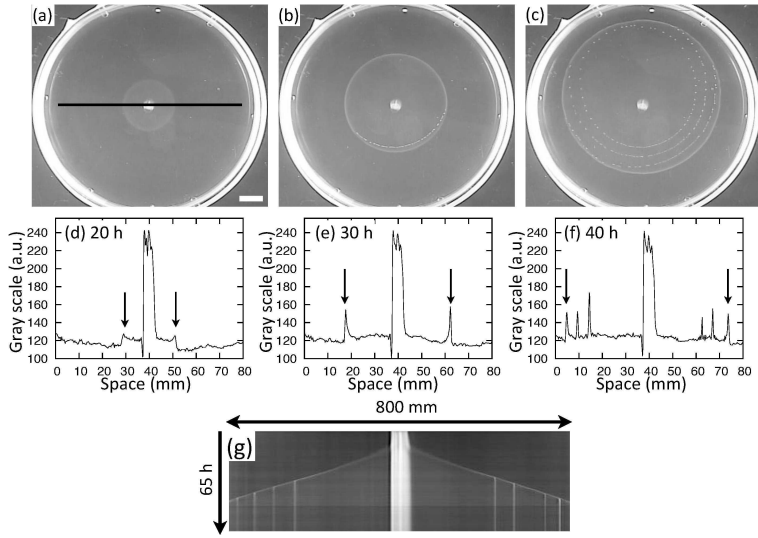


図 5: 初期濃度が2mMのコハク酸塩について、0.2%の寒天での伝播パルスとドットパターン。(a, d)、(b, e)、(c, f)はそれぞれ接種後の20時間、30時間と40時間後の状態である。(d)-(f)は(a)の黒い線に沿った透過光の強さである。矢印の位置は、伝播パルスの前面を示している。(g)は(a)の黒い線に沿った伝播パルスの前面の位置の空間-時間に関する図である。

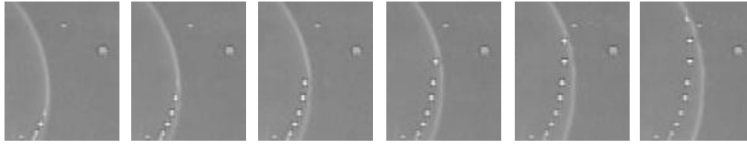


図 6: 図 5 (a)-(c) の右中央部のセンターリングの拡大図。左から右に時間が経過している。

3 成長-拡散-走化性モデル

図 8 は大腸菌パターン形成を理解するために提案された最小モデルの概略図である。対応するモデル方程式は

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial u}{\partial t} &= g(u, n) - i(u, n) + D_u \nabla^2 u - \alpha \nabla \cdot (u \nabla \rho) \\
 \frac{\partial v}{\partial t} &= i(u, n) \\
 \frac{\partial \rho}{\partial t} &= a n u - b \rho + D_\rho \nabla^2 \rho \\
 \frac{\partial n}{\partial t} &= -\beta g(u, n) - a n u + D_n \nabla^2 n.
 \end{aligned}$$

u と v は大腸菌の活性および不活性細胞の密度、 ρ と n は化学誘引物質と栄養の濃度である。増殖項 $g(u, n)$ は大腸菌の活性細胞が栄養を消費して増加することを示している。新たに成長を阻害する効果を $g(u, n)$ の中に $-du^3$ として導入した。これは細胞が老廃物などを分泌することによる。活性細胞はランダムな効果と化学誘引物質の濃度勾配による走化性効果により移動するとし、第 1 式の第 3、4 項がそれを表現してい

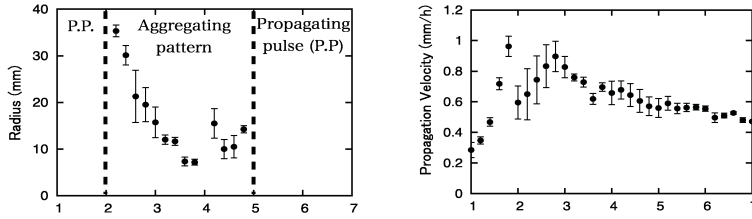


図 7: 0.24 %の寒天で初期栄養濃度と伝播パルス速度 (右図) との最初の集合ドットが出現する半径 (左図)。

る。第 2 項 $i(u, n)$ は不活性細胞への転換を表し、栄養分の減少により転換率が高くなる。化学誘引物質は活性細胞が分泌し、その生産にはエネルギーとして栄養を消費する。また、誘引物質は、自然分解されるとして $-b\rho$ を仮定する。

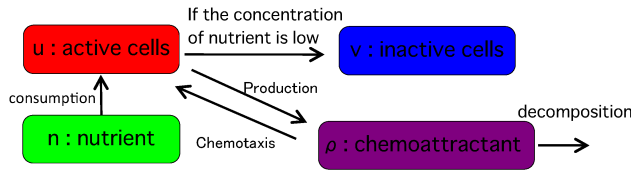


図 8: 大腸菌パターンを記述する最小モデル

$$g(u, n) = \frac{1}{2} (1 + \tanh(100(u - 0.02))) nu - du^3, \quad i(u, n) = \frac{0.2}{1 + \frac{n}{0.5}} u,$$

$$\beta = 1, \quad \gamma = 1, \quad D_u = 0.5, \quad D_\rho = 1., \quad D_n = 1.$$

モデル方程式の数値計算により、1 次元領域での全細胞 $u + v$ に対する伝播するパルスの存在を示した (図 9)。これは図 4 (d)-(f) で示された実験結果と類似なパルスである。次に、伝播パルスの速さと初期栄養濃度の関係を調べる。図 10 で示された栄養の初期濃度に依存した関係は図 7 で示した実験のそれとかなり一致している。図 11 は、2 次元帯状領域における典型的な数値計算結果である。初期の状態では一様な伝播パルス解が安定に存在するが (図 11 (a))、続いて先端のパルスの内部で集中化が進みドットが出現する (図 11 (b))。次に集合領域が複数の孤立伝播パルスとなる (図 11 (c), (d))。これは 2 次元での放射線状に細胞の集合領域が広がっていく実験結果 (図 1 (d)) を再現しているようにも見える。

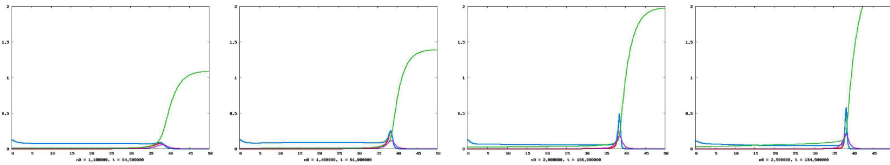


図 9: $\alpha = 15.0$ 、活性細胞の密度 u 、全細胞の密度 $u + v$ 、栄養の濃度 n 、化学物質の濃度 ρ のグラフ。初期値: $u(0, x) = e^{-16x^2}$, $v(0, x) = 0$, $\rho(0, x) = 0$, 左図から初期栄養濃度 $n(0, x) = 1.1, 1.4, 2.0, 2.5$ 。

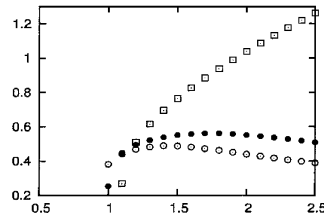


図 10: 走化性係数 $\alpha = 0.0, 10.0, 15.0$ (□、●、○の順) のとき、1次元伝播パルスの速度と初期栄養濃度の関係。

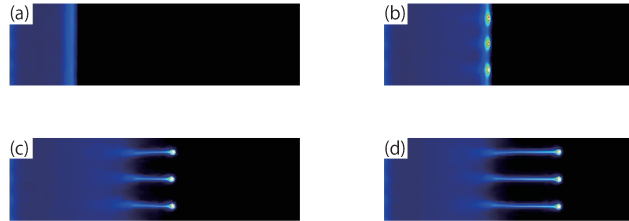


図 11: $\alpha = 15.0$ 、2次元帯状領域で上下の境界では反射条件としたときの数値計算. 白い部分が全細胞 $u+v$ の高密度な領域. 初期値: $u(0, x, y) = e^{-16x^2}$, $v(0, x, y) = 0$, $\rho(0, x, y) = 0$, $n(0, x, y) = 1.6$.

4 まとめ

この論文では Budrene と Berg [2]、[3] によって報告された大腸菌の自己組織化されたパターンについて、われわれの実験結果とそのメカニズムを理解するために提案されたモデル方程式の数値計算結果を述べた。図 7 で示したように、実験において伝播するパルスの速度は栄養濃度を増やしていくと、増加から減少に転じた。我々は、提唱した成長-反応-走化性方程式を用いて 1 次元領域において、栄養の初期濃度と伝播するパルスの速度の間の関係を数値的に示した (図 10)。このように、伝播するパルスに焦点を当てて、実験と数値計算に結果が類似していることを示した。しかし、我々のモデルを含むすべてのモデルが、2 次元領域において伝播するパルスの出現メカニズムを明らかにしたわけではない。Budrene と Berg [3] は、複雑なパターン形成を理解するために “どのようにして、群れリングの状態が維持されるか?” にも言及した。しかし、伝播パルスの出現メカニズムははまだ未決問題であると思われる。我々の実験および数値計算の結果が運動性のある細胞の自己組織化されたパターン形成を理解するための契機となることを期待している。

参考文献

- [1] E. coli in Motion ed. by H. C. Berg, Springer (2004).
- [2] E. O. Budrene and H. C. Berg: Complex patterns formed by motile cells of Escherichia coli. *Nature* **349**, 630-633 (1991).
- [3] E. O. Budrene and H. C. Berg: Dynamics of formation of symmetrical patterns by chemotactic bacteria. *Nature* **376**, 49-53 (1995).
- [4] E. O. Budrene, I. Cohen, H. Levine, Cooperative self-organization of microorganisms, *Adv. Phys.*, **49**, 395-554 (2000).

- [5] R. Tokita, T. Katoh, Y. Maeda, J. Wakita, M. Sano, T. Matsuyama, M. Matsushita: Pattern Formation of Bacterial Colonies by *Escherichia coli*, *J. Phys. Soc. Jpn.* **78** 074005-074005-6 (2009).
- [6] M. Matsushita, J. Wakita, H. Itoh, I. Rafols, T. Matsuyama, H. Sakaguchi, M. Mimura: Interface growth and pattern formation in bacterial colonies, *Physica A* **249**, 517-524 (1998).
- [7] M. Mimura, H. Sakaguchi, M. Matsushita: Reaction-diffusion modelling of bacterial colony patterns *Physica A* **282**, 283-303 (2000).
- [8] E. Ben-Jacob, O. Schochet, A. Tenenbaum, I. Cohen, A. Czirok and T. Vicsek: Generic modelling of cooperative growth patterns in bacterial colonies. *Nature* **368**, 46-49 (1994).
- [9] I. Golding, Y. Kozlovsky, I. Cohen, E. Ben-Jacob: Studies of bacterial branching growth using reaction-diffusion models for colonial development. *Physica A* **260**, 510-554 (1998)
- [10] Y. Kozlovsky, I. Cohen, I. Golding, and E. Ben-Jacob: Lubricating bacteria model for branching growth of bacterial colonies *Phys. Rev. E* **59**, 7025-7035 (1999).
- [11] H. C. Berg and D. A. Brown: Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by Three-dimensional Tracking. *Nature* **239**, 500-504 (1972).
- [12] Random Walks in Biology ed. by H. C. Berg, Princeton Univ Press (1993).
- [13] J. Adler: Chemotaxis in bacteria. *Science* **153**, 708-16 (1966).
- [14] H. C. Berg and L. Turner: Chemotaxis of bacteria in glass capillary arrays. *Biophys.J.* **58**, 919-930 (1990).
- [15] Chemotaxis ed. by M Eisenbach, Imperial College Press (2004).
- [16] L. Tsimring, H. Levine, I. Aranson, E. Ben-Jacob, I. Cohen, O Shochet, and W. N. Reynolds: Aggregation Patterns in Stressed Bacteria. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 1859-1862 (1995).
- [17] E. Ben-Jacob, I. Cohen, O. Shochet, I. Aranson, H. Levine, L. Tsimring: Complex Bacterial Patterns. *Nature* **373**, 566-567 (1995)
- [18] R. Tyson, S. R. Lubkin and J. D. Murray: A minimal mechanism for bacterial pattern formation. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 299-304 (1999).
- [19] A. A. Polezhaev R. A. Pashkov, A. I. Lobanov and I. B. Petrov: Spatial patterns formed by chemotactic bacteria *Escherichia coli*. *Int. J. Dev. Biol.* **50**, 309-314 (2006).
- [20] A. Aotani, M. Mimura and T. Mollee: A model aided understanding of spot pattern formation in chemotactic *E. coli* colonies. *Japan J. Indust. Appl. Math.* **27**, 5-22 (2010).
- [21] Experiments in Molecular Genetics ed. by J. H. Miller, Cold Spring Harbor Laboratory Pr (1972).