

***Bacillus subtilis*（納豆菌）の初期コロニー形成における
特異的な増殖様式：走査電子顕微鏡による研究**

Characteristic Growth Pattern of Initial Colony in
Bacillus subtilis: Study by Scanning Electron Microscopy

熊 田 薫
Kaoru KUMADA

岩 間 明 文
Akifumi IWAMA
(三洋電機筑波研究所生体情報研究室)

要 旨

Bacillus subtilis のある種の株は、寒天平板上での増殖のはじめの段階において複雑に曲折する一本のひものような増殖様式をとった。その後、細胞のフィラメントは複雑に曲折しながら平面を埋めていった。これは一次元的な細胞の成長を二次元的な増殖に結びつけ、寒天平面を有効に利用してゆく過程であると考えられた。平面をある程度埋め尽くした後、増殖は2つの異なる要素を含んでいるように思われた。1つはコロニーの内部で主として働く、三次元的な増殖（立体化）であり、他の1つはコロニーの周辺で生じる、さらに広く平面を確保しようとする機構である。われわれは、この特異なマイクロコロニーの形態を、光学顕微鏡および走査電子顕微鏡（SEM）を用いて観察した。本報では、主としてSEMによる *B. subtilis* のコロニー形成の初期過程を述べ、コロニーは単細胞生物の集合体でありながら、統制された一個の多細胞生物のような性質をも有していることを述べる。

はじめに

細菌が、寒天培地のような平板培地上で規則正しいコロニーを形成することは広く知られている。コロニーの形態は、細菌の種や、系統により異なるため、コロニー形態から細菌種や、系統をある程度推定することも可能である。近年、大腸菌 (*Escherichia coli*) や、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) などを用いてコロニー形成過程や、細胞種の構成などが調べられ、一つのコロニーは分化したいくつかの性質の異なる細胞からなることや、コロニー形成の際に個々の細胞は勝手に増えるのではなく、多細胞生物的な協調的行動をしていることなどが明らかとなってきた。従って、細菌のコロニー形成過程の研究は、生物の形態形成機構を解明するための単純な基本的なモデルを提供すると考えられている。

細菌のコロニーは、多数の細胞、分泌物質などで構成される。これらの配列でできるミクロな構造が、マクロなコロニー形態を規定していると考えられる。このミクロな構造及びマクロな形態の形成過程を観察するのに走査型電子顕微鏡¹⁵⁾、タイムラプス・ビデオ¹⁷⁾などが用いられ興味ある知見を提供している。これまでに、大腸菌、ブドウ球菌⁶⁾などのコロニー形成過程が研究されている。大腸菌では、最初の分裂で2個に増えた細菌が平行に並び増殖を開始し、最終的には異なる生化学的性状の細胞群が一つのコロニーにあるパターンで存在するようになる¹⁸⁾。これらの形成過程において個々の細胞は周囲の細胞と相互作用しながらコロニー内での位置取りが行われる。これらの観察は、大腸菌のコロニー形成過程に、多細胞生物の形態形成過程を連想させるような制御機構の存在を示唆している。同様な制御機構が他種の細菌のコロニー形成過程で働いていることは容易に予想できるが、細菌種の違いに伴うコロニー形態の多様さを考えると、一部の種で得られた知見から他種のコロニー形成機構を予想することは困難である。

Bacillus subtilis（納豆菌）は、土壌および植物体表面に生息する細菌の一種で、生化学的な性状

も良く調べられ、増殖培地も良く確立されており、コロニー形成機構を調べるのに適した種である。通常の寒天培地上で37℃で培養するとほぼ1日で肉眼的には円形に見える独特なコロニーを形成する。このコロニーは、寒天培地上に平面的に広がっているのみではなく、多くの突起物が立体的に突出している⁹。*B. subtilis* のコロニー形態は大腸菌などの規則正しいコロニー形態とは異なり、複雑な形態を示している。形成される形態のパターンが培地の栄養条件や寒天の硬さによって変動することおよびその形態がフラクタルな図形になることについて報告されている^{7,13}。さらに形態形成の数理モデルについても種々の研究がなされている^{2,14}。しかし、*B. subtilis* のコロニー形態の観察は主として比較的マクロな観察が多く、個々の細菌のミクロな行動様式とマクロなコロニー形態との関係についての報告は少なかった。

われわれは、*B. subtilis* のコロニー形成の過程を光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察し、その特異な増殖様式および形態について一連の報告をおこなってきた^{4,9,10,11,12}。本報では、寒天平板上の一個の *B. subtilis* 細胞が分断することなく「一筆書き」成長をしマイクロコロニーを形成してゆく過程を、SEM による観察を中心にして述べ、その生態学的意義を考察した。

材料と方法

菌株

菌株としては *B. subtilis* I2株 (日本オペレーター(株)より分譲) を用いた。この株は稲わらから分離したものであり、分類学上は *B. subtilis* に分類されている³。産業上は納豆菌と呼ばれ納豆製造に用いられる株であり、多量の粘質物を産生しかつその増殖にビオチンを必要とするが、基本的な生化学的性状は *B. subtilis* に一致した⁸。またべん毛の形成は今回用いた培地においては認められず、軟寒天上での運動性も認められなかった。

培地および培養条件

前培養は普通ブイヨン (栄研) を用い、37℃約18時間120rpmで振とう培養した。この培養液を0.85%滅菌食塩水で1000~10000倍に希釈し寒天培地に接種した。振とうした培養液中では、寒天上のように長くはないがフィラメント状の増殖を示しているものと単独の細胞が混在していた。接種した寒天培地上では培養の初期において単独の菌体を発見し観察することは容易であった。これには希釈時の試験管ミキサーによる攪拌による効果も考えられた。寒天培地は普通寒天培地 (栄研) を常法に従い用いた。シャーレは直径9 cmのものを用い、底の部分を長方形にくり抜き、この部分にカバーガラスを張り付けた。この様にして制作したシャーレに培地を薄くまき固めた。これにより菌体までの距離を短くすることができカバーガラスと寒天培地を通してシャーレのふたを取ることなく時間的に連続した光学顕微鏡観察が可能となった。

光学顕微鏡による観察

菌液を接種したシャーレを37℃に保ち、カバーガラスの側からカバーガラスと寒天を通して菌体の増殖を観察した。シャーレのふたを開け菌体の側から観察すると培地が急速に乾燥し数時間にわたる継続的な観察は不可能であったので、シャーレのふたを開けることはしなかった。培養時間は1～7時間程度であった。

走査型電子顕微鏡による観察

寒天平板上に形成されたマイクロコロニーをフォルムアルデヒド蒸気で処理し、細菌細胞を固定した。固定後平板を室内に静置し約1週間乾燥させ寒天のフィルムを形成させた。このフィルムからコロニーがある部分を切り出し、試料台に貼りイオンコーター（イオンコーターIB-3）で金を約200nmに蒸着し、走査電子顕微鏡（ABT-55, Akashi Co., Ltd）により二次電子を観察した。真空度は 10^{-5} - 10^{-4} torrとした。

結果と考察

B. subtilis（納豆菌）は長さが2～10 μ mの比較的大型の桿菌である。図1 aに寒天培地平板上に接種した、分裂前の細胞（右）および1回分裂した細胞（左）を示した。培養時間は1～3時間であった。培養を継続すると図1 bおよびcに示すように一直線上に伸びていった。しかし、ある長さまで伸びると中心部付近において折れ曲がった。図1 dの菌体の長さは約170 μ mであるが、1個の細胞の長さを5 μ mと仮定すれば34個の細胞が分断せずつながっていることになる。

図2に細胞のひもが分断しない「一筆書き」を保ちながら、複雑な曲折を描く様子を示した。図2 aでは折れ曲がりの根本の部分がくびれ、細胞同士が接触していた。図2 bでは折れ曲がり複数個生じ、くびれた部分の菌の糸が平行に並んでいるのが認められた。図2 cにおいては、曲折が複雑さを増しながら平面を埋め尽くしていった。図2 dでは菌体が平行に並んでいる部分の他に、菌のひも同士が重なり合っている部分が認められた。したがってこの段階では「一筆書き」が保たれているかどうかについては正確にはわからない。また図a, bおよびcでは菌のひもの両端がコロニーから外に伸びていた。dでは1つの先端のみがコロニーから外に伸びており、もう1つの先端はコロニー内にまきこまれているように思われた。

われわれは1個の細胞が増殖する過程を、光学顕微鏡により約6時間にわたり経時的に観察している⁴⁾。それによれば、培養開始後のしばらくの時間生ずるラグを除いては、菌のフィラメントの全長は指数関数的に増加していた。また一般に、ある図形を完全に囲む円を描いたとき、この様な円の中で最も小さい円の直径を、もとの図形の直径と呼ぶ。表1に図1および図2のSEM像のいくつかの直径を示した。細菌細胞はこの間指数関数的に伸長しているにも関わらず、直径の増大は顕著ではない。このことは菌のひもの長さの増加が、コロニーの二次元的な成長つまり

平面の充填に主として寄与していることを意味する。また図3 aでは、細胞の重なり合いすなわち三次元的な増殖が起きている。したがってこの段階では、細胞のフィラメント長の増大はコロニーの外側への領域拡張ではなく、コロニー内における2次的、3次的な密度の増大に寄与していることになる。

図3に培養開始後5.5時間経過したコロニーを示した。全体としては円形に近づき、培養時間の短いコロニー(図2)のような不均等な増殖は示していない(図3 a)。しかし細部はいぜんとして細胞のフィラメントが複雑なカーブを描いていた(図3 b)。また細胞のフィラメントの先端はコロニーから外に伸びていず、内部に巻き込まれるようになったが、2つ確認できた。そのうちの1つを図3 bの矢印で示した。フィラメントの分断が起きていれば先端は4つ以上存在するはずであるが、認められなかった。内部はフィラメントが重なり合い立体的な構造を取り始めていた(図3 c)。ただし厚さは均一ではなく、寒天が見えている部分および数層の重なりを呈してい

表1 マイクロコロニーの直径

図	直径 (μm)
図2 a	143
図2 b	206
図2 c	253
図2 d	320
図3 a	270

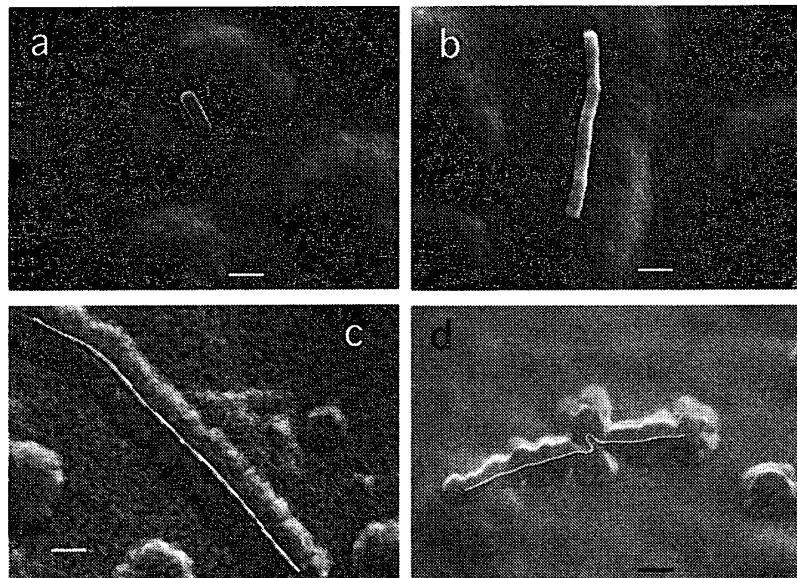


Fig. 1. Initial shapes of *Bacillus subtilis* cell filaments on the agar plate. Cell filament grew from (a) to (d) in progression.

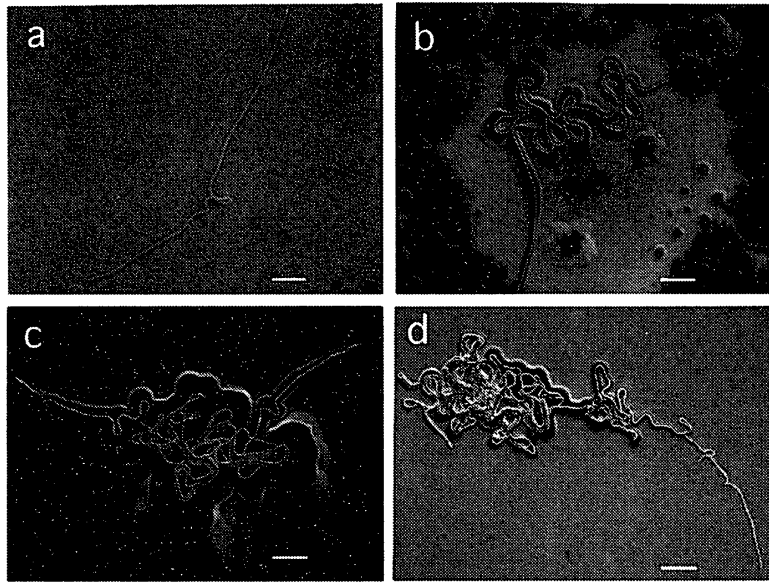


Fig.2. Micro-colony drawing the curved string without cut off one string.

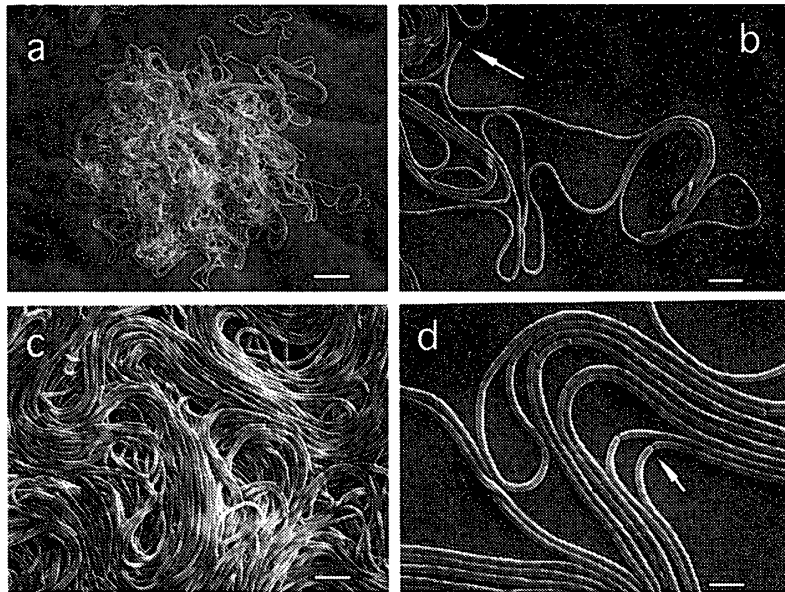


Fig. 3. Micro-colony cultivated on the agar surface for 5.5 h.
 (a) : whole image of the colony.
 (b) : peripheral area; the arrow shows a tip of the cell filament.
 (c) : central area.
 (d) : cell filament; the arrow shows a septum between cells.

る部分があった。われわれは通常のサイズのコロニーについても観察を進めている。そこではコロニー表面には数多くの突起や穴状の構造が存在している⁹⁾。細胞フィラメントの重なり厚さの不均一性は、増殖の過程で増幅され、通常サイズのコロニーでは穴や突起となると考えられる。図3 dにフィラメントを構成する個々の細胞が明瞭に認められる像を示した。細胞の長さは $3\mu\text{m}$ ~ $10\mu\text{m}$ であった。

増殖の初期の段階から菌のフィラメントのツイストが認められる場合があった。図4に増殖開始後3時間のコロニーに生じたツイストを示した。一本のひもが弧を描いて往復しながらツイストする構造を取り、多くの場合右巻きらせん状に伸びていた。*B. subtilis*のある種の変異株が液体培地中で増殖し、右または左巻きらせん状にツイスト現象は Mendelson^{15,16)}らが報告している。ここにおいて分子レベルの事象が細胞レベルの事象に影響をおよぼし、さらに細胞レベルの事象が多細胞レベルの事象に影響をおよぼすと述べている。われわれの実験では、寒天平板上でもツイストが生じ、この細胞のツイストがコロニーの形態形成に対しても影響を及ぼしていることを示している。Mendelson らが用いた株はニトロソゲアニジン処理によって得たものであるが、本報で用いた株は自然界から得たものであり、I2株以外でも納豆菌では「一筆書き」増殖とツイストはしばしば認められた。

本報で用いた*B. subtilis* I2株は、*E. coli*や他の*B. subtilis*株と異なり特異なフィラメント状の増殖を示した。初め直線状に伸びたフィラメントは、ある程度の長さになると中央付近で折れ曲がり、複雑なカーブを描き始め二次元的な広がりを見せ始めた。約5.5時間後には全体としては円形に近いコロニーとなり、立体的な構造を取り始めた。しかし細部は円の一部になることはなく、その複雑性を維持した。この間フィラメントは切断されず「一筆書き」状の構造は保たれているように思われた。

細菌細胞が植物体表面や寒天面上で効率的に増殖し、子孫を増やしていくためには、増殖に必要な領域を確保することと、確保した領域を効率的に利用することが必要である。*B. subtilis* I2株は、この両者の条件を満たした増殖様式をとっているように思われる。フィラメントが切断しな

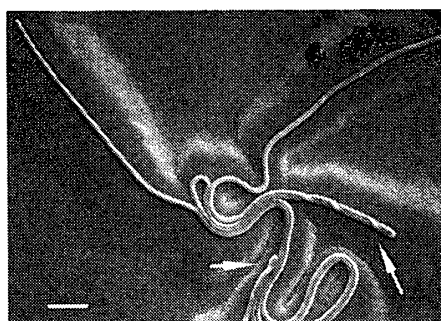


Fig.4. Twisted cell filament at the initial growth phase.

いことによりコロニーから外側に領域を確保することが可能になる。液体中ではべん毛により活発な運動性を示す細菌も数多く存在するが、固体表面では細菌細胞は単独では運動できない。しかしフィラメント状につながることで、増殖による長さの増大が細胞の移動を生み出している。一方、複雑に折れ曲がるカーブが二次元的な領域の確保に役立つと同時に、重なり合うことにより三次元的な構造をとりやすくしている。

Shapiro らは、*E. coli* や *Pseudomonas putida* などのコロニーの形態形成過程の研究を通して、コロニーは単に増殖の結果、細胞が集合したものではなく、細胞同士が有機的に関連を持ちながらあたかも一個の多細胞生物のようにふるまっていると考えている^{19,20}。*B. subtilis* I2株のコロニー形成過程は、細菌の領域確保と領域の効率的利用におけるコロニーの多細胞生物的性質を垣間見せるユニークな一例であると考えられる。

引用文献

1. Afrikan, E. G., G. S. Julian and L. A. Bulla JR. 1973. Scanning electron microscopy of bacterial colonies. *Appl. Microbiology*. 26:934-937.
2. Ben-jacob, E., O. Schochet, A. Tenenbaum, I. Cohen, A. Czirok and T. Vicsek. 1994. Generic modelling of cooperative growth patterns in bacterial colonies. *Nature*. 368:46-49.
3. Sneath, P. H. A., *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2., The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
4. 岩間明文, 熊田薫. 1994. 生物物理学会
5. Drucker, D. B. and Whittaker D. K. 1971. Examination of certain bacterial colonies by scanning electron microscopy. *Microbios*. 4: 109-113.
6. Fass, J. R. 1973. Morphology and ultrastructure of staphylococcal L colonies: light, scanning, and transmission electron microscopy. *J. of Bacteriology*. 113: 1049-1053.
7. Fujikawa, H. and Matsushita M. 1991. Bacterial fractal growth in the concentration field of nutrient *J. of the Physical society of Japan*. 60: 88-94.
8. 熊田薫, 恩賀勉, 星野尋志, 友寄るみ子, 小池和子, 1993. フィブリン溶解能を高度に有する納豆菌の分離. *医学と生物学*. 126: 299-303.
9. 熊田薫, 岩間明文, 高橋泰二. 1994 *Bacillus subtilis* (納豆菌) コロニーの微細構造. 微生物生態学会.
10. 熊田薫, 岩間明文, 1995. *Bacillus subtilis* におけるコロニーの形成過程およびその構造. 日本細菌学雑誌. 50: 227.
11. 熊田薫, 岩間明文, 高橋泰二. 1995 *Bacillus subtilis* コロニーにおける表面占拠の多様性. 微生物生態学会.

12. 熊田薫, 岩間明文, 高橋泰二. 1996 *Bacillus subtilis* のコロニー形成の初期過程: 寒天濃度による形態の変化. 微生物生態学会雑誌
13. 松山東平, 松下貢. 1995. 細菌の集落形態と集団行動. 日本細菌学雑誌. 50: 491–500.
14. Matsuyama, T. and Matsushita M. 1992. Self-similar colony morphogenesis by gram-negative rods as the experimental model of fractal growth by a cell population. Appl. environ. microbiology. 1992: 1227–1232.
15. Mendelson, N. H. 1976. Helical growth of *Bacillus subtilis*: A new model of cell growth. Proc. Natl. Acad. Sci. 73. 1740–1744.
16. Mendelson, N. H. and J. J. Thwaites. 1993. Bacterial macrofibers: Multicellular chiral structures. ASM News. 59. 25–30.
17. Shapiro, J. A. and C. Hsu. 1989. *Escherichia coli* K-12 cell-cell interactions seen by time-lapse video. J. of Bacteriology. 171: 5963–5974.
18. Shapiro, J. A. 1987. Organization of developing *Escherichia coli* colonies viewed by scanning electron microscopy. J. of Bacteriology. 169: 142–156.
19. Shapiro, J. A. 1985. Scanning electron microscope study of *Pseudomonas putida* colonies. J. of Bacteriology. 164: 1171–1181.
20. Shapiro, J. A. 1988. Bacteria as multicellular organisms. Scientific American. 82–89.