

	あべ たかひろ	
氏 名	阿部 貴寛	
授 与 学 位	博士 (工学)	
学位授与年月日	平成29年3月24日	
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項	
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 応用物理学専攻	
学位論文題目	バクテリアの走化性と集団行動に関する研究	
指 導 教 員	東北大学教授 工藤 成史	
論文審査委員	主査 東北大学教授 工藤 成史 東北大学教授 佐々木 一夫 東北大学教授 石川 拓司 東北大学教授 早川 美徳	

論文内容要旨

<第1章: 序論>

バクテリアはべん毛と呼ばれる運動器官と菌体と呼ばれる部分から成り、べん毛を高速回転させて、直線的な遊泳（ラン）と方向転換（タンブリング）を繰り返しながら水中を移動する。その際に、細胞膜に埋め込まれた受容体により周囲に存在する特定の化学物質の濃度勾配を検知し、方向性を持った行動（走化性）を起こす（図1）。この現象は、バクテリアがアミノ酸のような好ましい物質の濃度がより高い方向に移動するために、あるいはフェノールのような好ましくない物質から遠ざかるために重要である。細菌密度が低いときの走化性応答は、ランダムウォークの一種であるバイアスランダムウォーク（Biased - Random Walk）であることが知られている。しかし、バクテリアが誘引物質に対して集まるほど細胞密度が高くなる。バイオフィームや宿主体内でのバクテリアの生存状態においても非常に高い細胞密度であると考えられる。走化性を示し始めてから高密度な状態になる

までを含めたバクテリアの動態、特に集団形成・集団行動についてはよく調べられていない。本研究では、バクテリアが集合する過程で発生する集団全体での現象を明らかにするとともに、集団中での個々の菌の運動に特異的な現象も明らかにし、それらの物理的メカニズムを解明することを目的とした。

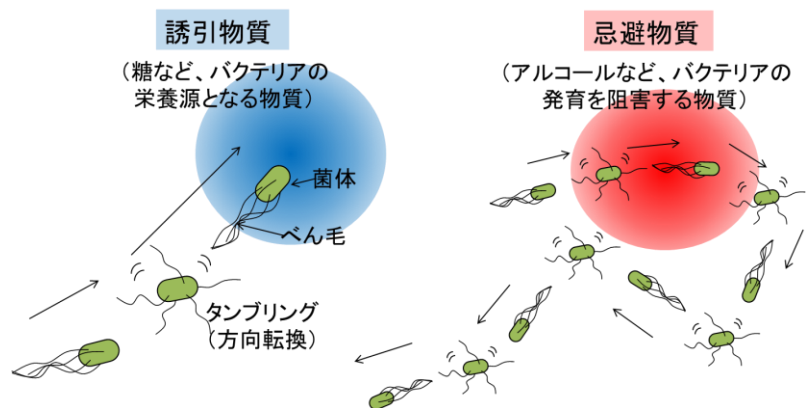


図1 バクテリアの走化性

<第2章: キャピラリーアッセイを用いたマクロなバクテリア集団行動解析>

改良型のキャピラリーアッセイを用いて、サルモネラ菌の集合過程を定量的に解析した。キャピラリー付近での菌数の時間変化を測定したところ、徐々に菌が集合し、数分で菌密度が一定になった。菌の集合は、キャピラリー付近での観察面の高さで様子が異なり、キャピラリー付近よりもキャピラリーから下の部分に多くの菌が集合していることが分かった。これにより、菌の集団を下向きに運ぶような力が働いていることが示唆された。

菌数の時間変化から示唆された下向きに働く力は“流れ”による可能性が高いと考え、PIV (Particle Image Velocimetry)による流れ解析を行った。その結果、誘引物質への正の走化性応答によりキャピラリー周辺の細胞数が増加するにつれて、図2のように、サルモネラ菌の大きさ(数 μm)に対し数百倍のスケール(mm程度)の対流が発生していることが分かった。PIVの結果から流速の時間変化を求めたところ、流速の最大値は約 $7\mu\text{m/s}$ であった。

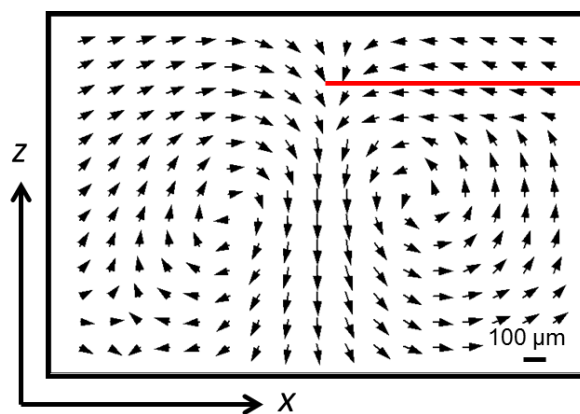


図2 サルモネラ菌集団により誘起された対流現象

対流発生メカニズムを知るために、対流発生に関係するファクターを調べる実験を行った。1つ目のファクターとして調べたのが“重力”である。対流はキャピラリー付近で下向きに流れていることから重力が対流発生に関わっていると考えた。密度勾配作製溶液 Percoll を用いて溶液の比重をサルモネラ菌自身の比重よりも高めることで、菌にかかる浮力を大きくし、見かけの重力の大きさを変化させた状態でキャピラリーアッセイを行った。その結果、対流の逆転現象が観察され、対流発生に重力が重要であることが分かった。2つ目のファクターとして調べたのが“走化性”である。走化性たんぱく質をすべて欠損したサルモネラ菌株を用いた実験、およびキャピラリー内に誘引物質が含まれていない状態での実験を行ったところ、対流の発生は見られなかった。これにより、菌が誘引物質に対して走化性を示しキャピラリー付近に集合することも、対流発生の重要なファクターであることが示された。以上2つのファクターは、好気性の原生物や枯草菌で観測されている生物対流と呼ばれる現象と共通していることから、本研究で観測された対流は生物対流の一種であると考えられる。さらに菌数の時間変化と流速の時間変化を比較したところ、対流が発生するのは菌数が飽和してから数分後であること、また菌の集合領域が広がるにつれて流速が大きくなる傾向のあることが分かった。すなわち、細胞がキャピラリー周辺に集合する際の空間的な広がり対流発生に対して重要であることが示唆された。この点についてより詳細に検討するため、キャピラリー付近での菌の集団に対する力の釣り合いを考え、細菌集団の沈降により周囲の流体が一体となって引きずられ、対流が発生するというモデルを構築した。細菌集団の沈降速度を計算した結果から、流れ発生には、バクテリア集団と周りの密度差よりも、菌の集合領域の拡大が重要なパラメータであることが示された。この対流の生物学的意味としては、誘引物質攪拌の効果がまず考えられる。また、対流により誘引物質の近くに同じ菌が長い時間留まらず周りの領域との交代を可能にすることで、集団としての生存率を上げている可

能性も考えられる。

<第3章: ミクロなバクテリア集団行動解析>

集団中での個々のバクテリアの動きを詳しく解析するために、野生株のサルモネラ菌集団中に、少量のサルモネラ菌 GFP 導入株を混ぜてその動きを蛍光顕微鏡で観測する実験を行った。実験は、化学物質の濃度勾配がない状態で行い、GFP を導入した菌の遊泳軌跡を描いてそこから詳しい解析を行った。実験映像から、細胞密度依存的に菌の挙動が変化していることが分かっ

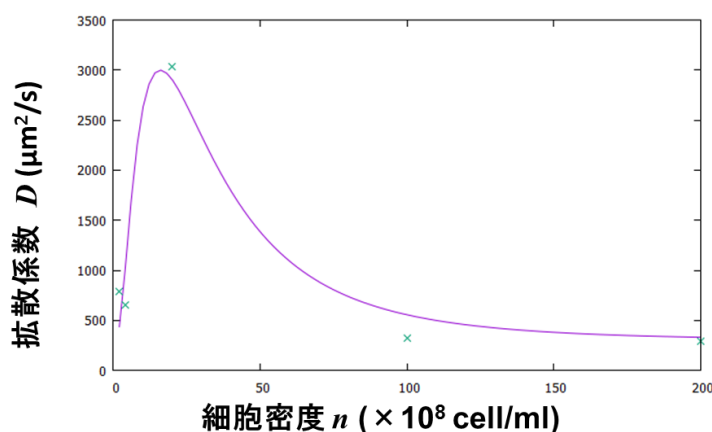


図3 サルモネラ菌の拡散係数の細胞密度依存性

たため、菌の拡散に注目して解析を行った。解析結果から化学物質の濃度勾配がない状況下では、菌の移動距離が細胞密度依存的に変化することが分かり、拡散係数を算出したところピークを持つ変化をすることが明らかとなった (図3)。類似の現象は大腸菌について過去の論文で報告されていたが、詳しい原因はわかっていない。そこで、この拡散係数の密度依存性の原因を突き止めるために、(1) 拡散係数の増加領域、(2) 拡散係数の減少領域の2つに分けて様々な解析を行った。はじめに遊泳時の角度変化の分布をみた。その結果、領域 (1) においては、角度分布に大きな違いはみられず、領域 (2) では、大きい角度変化の割合が増加していることが分かった。次に遊泳速度の分布を測定したところ、領域 (1) では、細胞密度の増加とともに分布がより速い領域にシフトしていることが分かった。領域 (2) においては、より遅い速度の領域にシフトしていた。2つの解析から、領域 (2) における拡散係数の減少は、衝突頻度の増加に伴う角度変化の増加および遊泳速度の減少が原因であると考えられる。しかし領域 (1) における拡散係数増加の原因を速度増加だけで説明するのは困難だった。そこで、領域 (1) に関して、遊泳時の角度の持続時間を測定してみた。その結果、細胞密度の増加に伴い角度 (遊泳方向) の持続時間が増加していることが分かった。また、角度相関を求めたところ、より近い菌同士の角度が揃っていることが明らかとなった。遊泳時に近くの菌同士の角度が揃うことが重要と考えられるため、Vicsek モデルを用いたシミュレーションを行った。Vicsek モデルは、アクティブマター分野で用いられる標準的なモデルであり、バクテリアの遊泳角度を周囲のバクテリアの角度との平均とするものである。その結果、時間経過とともにバクテリアの遊泳方向が揃う様子がシミュレートされ、そこから拡散係数および角度変化の持続時間を算出したところ、どちらの値も粒子数 (バクテリア数) の増加に伴い増加するという結果が得られた。これは、バクテリアが遊泳時に集団の平均にトラップされ個々の揺らぎが抑えられていることを示している。これらの結果から、領域 (1) では、細胞密度の増加に伴い衝突頻度が増加し、それにより遊泳方向が揃い、角度の持続時間が増加するとともに遊泳速度が増加することで、拡散係数が増加しているものと考えられる。本章で述べた拡散係数の細胞密度依存性にピークが存在するという現象は、バクテリアが動きやすいような細胞密度が存在していることを

示唆するものだとも言える。

<第4章: 結論>

本研究では、バクテリア集団の振る舞いを、集団全体としての運動と、個々の菌の運動という2つの観点から調べた。

集団全体については、サルモネラ菌が誘引物質のポイントソース周辺に集合した際に、対流が発生することを見出した。バクテリア集団にかかる重力により、バクテリア集団と周囲の流体が沈降することで、対流が発生していると考えられる。その時に重要なのが集合した領域の拡大であることが、実験とモデルから明らかになった。

集団中における個々のサルモネラ菌の運動解析から求めた拡散係数が、細胞密度依存的に変化し、ピークを持つことが分かった。細胞密度の増加に伴い拡散係数が増加する領域では、菌同士の衝突頻度が増加し、それにより遊泳方向が揃い、角度（遊泳方向）の持続時間が増加し遊泳速度が増加することが、拡散係数増加の原因であることが、実験およびシミュレーション結果から示された。また、さらに細胞密度が増加するに伴い拡散係数が減少する領域では、衝突頻度の増加に伴う角度変化の増加および遊泳速度の減少が、拡散係数を減少させていることが実験結果から示された。

これら2つの結果をふまえて考えると、バクテリアが走化性を示し集合する際には遊泳方向が揃うことで効率的に集合することができ、集合した後には集団を維持しやすくなっている可能性が考えられる（図4）。本研究で得られたバクテリアの集団としての振る舞いについてさらに理解を深めるためには、化学物質の濃度勾配が存在する環境下での集団行動解析が有用であろう。例えば、マイクロ流体デバイスを用いて化学物質濃度勾配環境をコントロールし、バクテリアの遊泳を観察する方法が考えられる。

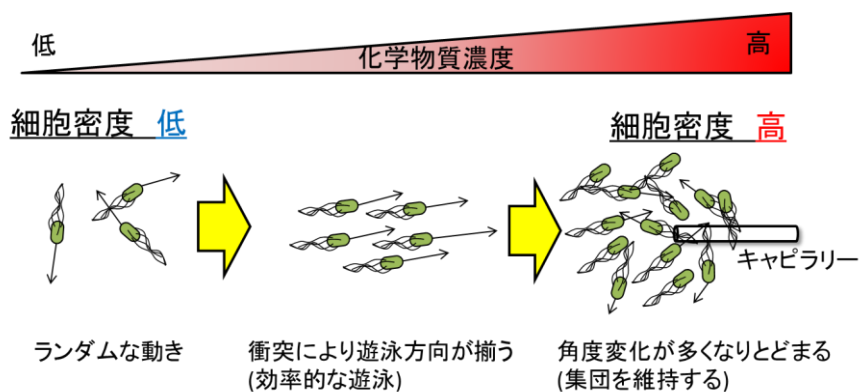


図4 走化性によるバクテリア集団行動モデル

論文審査結果の要旨

生物が集団として存在するときには、個として存在するときとは異なる振る舞いをするのが少なくない。微小世界の生き物であるバクテリアの場合にも、集団に特異的な現象がいくつか知られている。ここで、バクテリアの運動（移動）について見てみると、彼らの大きさがマイクロメートル程度しかないことから、常に熱ゆらぎの影響を受けており、拡散という形での移動が可能になる。一方で、多くのバクテリアはべん毛という運動器官を持ち、能動的に移動している。さらには、化学物質の濃度勾配を検知するセンサーを有しており、好ましい環境に試行錯誤的に近付いていく走化性という性質も備えている。このように、バクテリアは受動的に運動する微粒子ではなく、能動的に、それも環境を探索しながら運動している。このようなバクテリアが集団を形成した際にどのような現象が起こるのか、生物学だけでなく、物理学的にも、特に最近興味を持たれているアクティブマターの一例として、興味深いものがある。本研究では、バクテリアが集団を形成した際の集団全体の運動と、集団中での個々の菌の運動を調べることで、二つの異なるスケールそれぞれで起きている現象を見出すとともに、それらの物理的メカニズムを明らかにすることを目指した。

バクテリアの集団としての運動を調べるために、キャピラリーアッセイと呼ばれる手法を用いて、走化性により菌が集合する過程を調べた。キャピラリー付近にサルモネラ菌が集合する様子を位相差／明視野顕微鏡で観察・記録し、定量的に各種のパラメータを取得・解析した。菌数の時間変化を測定したところ、キャピラリー付近よりも下の部分により多くの菌が集合していることが明らかとなった。この結果から、バクテリア集団に下向きの流れが働いていることを想定し、流れ解析 (PIV: Particle Image Velocimetry)を行った。その結果、キャピラリーに菌が集合することで、数ミリメートルサイズの対流が形成されることが分かった。コントロール実験から、対流の発生には走化性による菌の集合と重力が必須のファクターであることが分かった。これらのファクターは好気性の原生物や枯草菌で観測されている生物対流と共通していることから、本研究で観測された対流は生物対流の一種であると考えられる。また、系を単純化したモデル計算により、対流の発生にはバクテリアの集合する領域の大きさが拡大することが重要であることが示された。対流の生物学的な意義として、誘引物質の近くに同じ菌が長い時間留まらずに周辺の菌と交代するのを促進することで、集団としての生存率を上げている可能性が考えられる。

集団中での個々のバクテリアの運動を解析するために、GFP を導入した少数のサルモネラ菌を野生型の菌の懸濁液に加え、蛍光顕微鏡下で観察・記録した。結果として、細胞密度依存的にバクテリアの拡散係数（能動的な移動成分を含む）がピークを持つことが分かった。これは、バクテリアのような自己推進する物体に特有の非常に興味深い現象である。このような現象が現れる原因を解明するために、まず、細胞密度とともに拡散係数が増加する領域について、バクテリアの遊泳時の角度（遊泳方向）の変化や持続時間、菌体間の角度相関、遊泳速度の分布を解析した。その結果、拡散係数の増加には遊泳時の菌の角度が揃うことが重要であることが示唆されたので、Vicsek モデルを用いたシミュレーションを行った。シミュレーション結果から、細胞密度の増加に伴い衝突頻度が増加し、それにより遊泳方向が揃い、角度の持続時間が増加し、遊泳速度も増加することで、拡散係数が増加しているというメカニズムが示唆された。これは、個々のバクテリアが集団にトラップされ、揺らぎが抑えられているためであるとも考えられる。次に、細胞密度とともに拡散係数が減少している領域について解析を行ったところ、衝突頻度の増加に伴う角度変化の増加および遊泳速度の減少が原因で、拡散係数が減少していることを示唆する結果が得られた。以上の結果は、バクテリアの走化性行動（誘引応答）において、初期の細胞密度が低い段階では遊泳方向が揃うことで菌が効率的に集合できるようになっており、集合して細胞密度が高くなった後は集団を維持しようとする方向の相互作用があることを示している。

以上のように本研究は、バクテリアが走化性により集団を形成した際に起こる新しい現象を見出すとともに、それについて定量的解析を行い、その物理的メカニズムを明らかにしたものであり、得られた知見は応用物理学の発展に寄与するものである。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。