

| | |
|---------|-------------------------------|
| 氏 名(本籍) | 望 月 正 己 |
| 学位の種類 | 農 学 博 士 |
| 学位記番号 | 農 博 第 3 7 4 号 |
| 学位授与年月日 | 昭 和 6 3 年 3 月 2 5 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 研究科専攻 | 東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻 |
| 学位論文題目 | 細菌のコロニー形成に関する速度論的研究 |

論文審査委員 (主 査)

教授 服部 勉

教授 水野 重樹

教授 伊崎 和夫

論文内容要旨

土壌中に生息している細菌の中で増殖している細胞は非常にまれで、大部分は増殖を停止した状態におかれていると考えられる。このような、非増殖状態にある細胞が新しく有機物などを得たとき、どのように増殖を開始するかを明らかにすることは、土壌中に生息している細菌の活動を明らかにする上で重要な意味をもつ。本研究では、培養細菌が増殖停止後どのように増殖を開始しコロニーを形成するかについて検討した。

純粋培養を行なった細菌の場合、平板上に出現するコロニー数と培養時間の関係は、一次反応と同じ形式で起こることより、次のようなFOR モデルとして定式化されている。培養 t 時間後まで出現したコロニー数 N_t は次のように与えられる。

$$N_t = N_{\infty} [1 - \exp \{-\lambda (t - t_r)\}] \quad (1)$$

ここで、 N_{∞} は最終的に出現するコロニー数、 λ はコロニーの出現速度、 t_r はコロニーが平板上に出現し始めるまでの待ち時間を表わし細菌の増殖により決まるパラメータである。このモデルでは、i) 接種された親細胞は一次反応の速度式にしたがって増殖を開始し、ii) 一度増殖を開始した細胞の増殖速度は一定である、ことが仮定されている。

本研究では、まず接種した親細胞の分裂過程及び各クローンの増殖過程の解析を通してモデルの仮定を検証し、つぎにこのモデルを用いて土壌細菌を中心にその類別をおこなうことを目的とする。第1章では、仮定 i) を検証するためマイクロ・カルチャーを用いて親細胞の分裂の過程を検討した。第2章では、仮定 ii) を検証するため各大きさのマイクロ・コロニー形成を検討した。第3章では、このモデルの考えが液体培地中における細菌の増殖開始にも当てはまることを示した。第4章では、土壌細菌を中心にコロニー形成を検討し、 t_r 値の変動パターンよりこれらの細菌が2つのタイプに分けられることを示した。

第1章 マイクロ・カルチャーを用いた親細胞の分裂の速度論

本章では、平板上におけるコロニー出現は一次反応として進行し、その速度に相当するパラメータ λ 値は、接種された親細胞の増殖開始を反映していることを検証する。このために、細菌細胞を顕微鏡下に設置したスライドガラス上に寒天培地ブロックを乗せたマイクロ・カルチャー上で培養し、接種された親細胞が分裂して減少してゆく過程を解析した。以下、 i 個以上の細胞よりなるマイクロ・コロニーを、 i -細胞マイクロ・コロニー、 i -細胞マイクロ・コロニー形成より得られたパラメータを $N_{\infty}(i)$ 、 $\lambda(i)$ 、 $t_r(i)$ とする。

(1) 式を書き換えると

$$\ln(N_0(2) - N_t(2)) = -\lambda(2)(t - t_r(2)) + \ln N_0(2) \quad (2)$$

E. coli、土壤細菌 *Agromonas* sp. (S711)、及び土壤よりの単離株 (S2D12) の未分裂の親細胞数は、一世代時間 $t_r(2)$ の後実線で示した FOR モデルの理論値とよく一致して減少した (図 1, 2, 3)。よって、親細胞はこのモデルに従って増殖を開始し、いったん増殖を開始した親細胞は一世代時間の後分裂したと考えられる。また、親細胞の培養齢が古くなるほど 3 株とも直線の傾きが小さくなっており (図 1, 2, 3)、増殖開始速度も遅くなったと考えられる。

親細胞が増殖期にあったとき、世代時間 $t_r(2)$ は 3 株とも最も短かった。定常期から死滅期にかけての、非増殖期にあった親細胞を接種したときについてみると、*E. coli* と *Agromonas* の世代時間は、接種した親細胞の培養齢が増加してもほぼ同じ値であったのに対し、S2D12 の世代時間は、親細胞の培養齢が 7 日のときに比べ 22 日及び 28 日では、約 6 時間増加した。

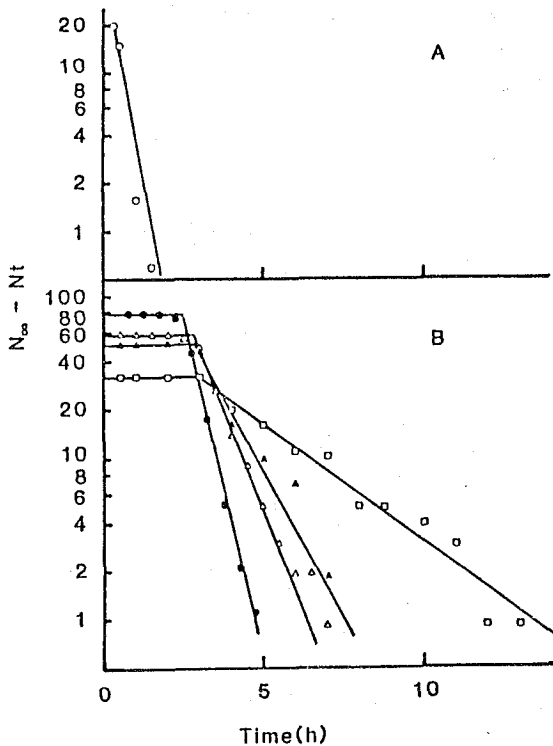


図 1 *E. coli* の親細胞の分裂と培養時間。接種した親細胞の培養齢が (A) 0.3 日 (○): (B) 1 日 (●)、4 日 (△)、7 日 (▲)、10 日 (□)。

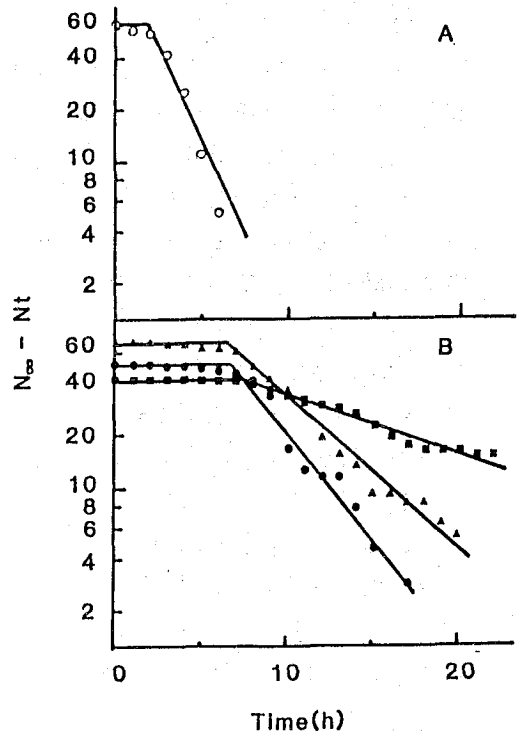


図 2 土壤細菌 *Agromonas* sp. (S711) の親細胞の分裂と培養時間。接種した親細胞の培養齢が (A) 1.5 日 (○): (B) 5.0 日 (●)、10.0 日 (▲)、33.9 日 (■)。

第2章 各大きさのマイクロ ・コロニー形成の速度論

本章では、一度増殖を開始した親細胞の増殖速度が一定であることを明らかにする目的で、FOR モデルを用いて各大きさのマイクロ・コロニーの形成を解析した。

図 4に培養齢が1 日の*E. coli* をマイクロ・カルチャー上で培養したときのマイクロ・コロニーの数を、大きさ別にプロットした。観測データは実線で示した FOR モデルと一致した。同様の結果が培養齢の異なる親細胞についても得られた。これらのパラメータの値を表 1に示した。2 株の土壌細菌、*Agromonas* と S2D12でも同様の結果が得られた。

マイクロ・コロニーの大きさ i の対数に対して、 $\ln(i)$ をプロットしたところ、図 5,6,7のような直線関係が得られた。このとき、培養が古くなり、 $\ln(i)$ 値が減少しても(表 1)、直線の傾きは一定であった。注目すべきことに、S2D12についても同様の結果が得られた(図 7)。よって、一度増殖を開始した細胞はほぼ同一の世代時間で分裂を続けると考えられる。したがって、培養齢が増加したとき、増殖を始めるまでの時間は、*E. coli* と *Agromonas* では一定なのに対し、S2D12では増加したと考えられる。

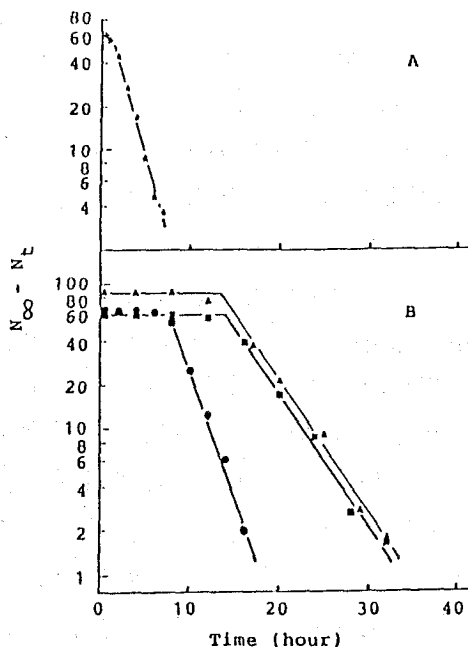


図 3 単離菌 (S2D12) の親細胞の分裂と培養時間。接種した親細胞の培養齢が (A) 0.9 日 (★): (B) 7.0日(●)、22.0日(▲)、28.0 日(■)。

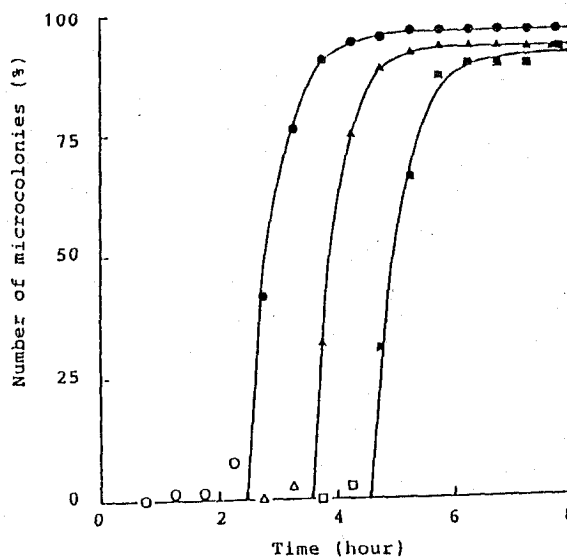


図 4 *E. coli* のマイクロ・コロニー形成。培養齢が1 日の親細胞を使用した。○、●、2-細胞；△、▲、4-細胞；□、■、8-細胞マイクロ・コロニー。

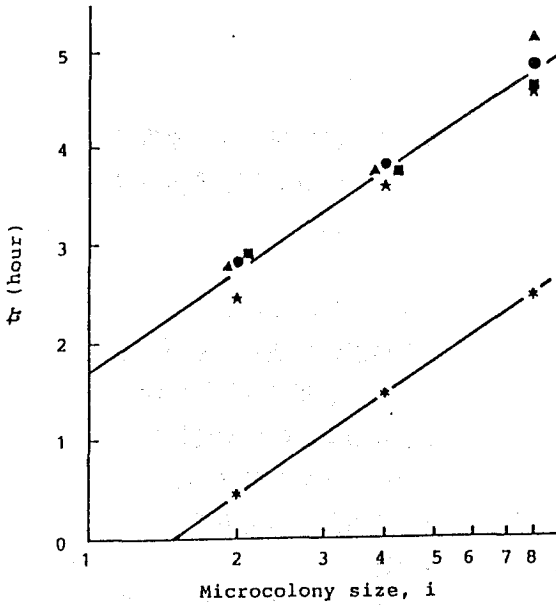


図5 *E. coli*のマイクロ・コロニーの大きさと t_r 値。接種した親細胞の培養齢が0.3日(＊)、1日(★)、4日(●)、7日(▲)、10日(■)。

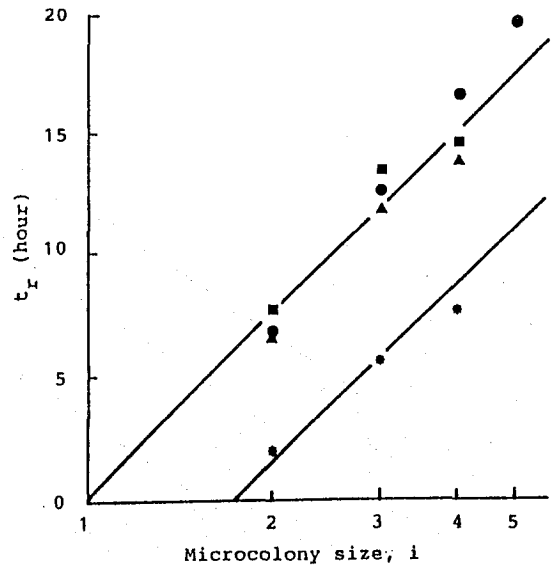


図6 土壌細菌 *Agromonas* sp. (S711)のマイクロ・コロニーの大きさと t_r 値。接種した親細胞の培養齢が1.5日(＊)、5.0日(●)、10.0日(▲)、33.9日(■)。

表1 *E. coli*によるマイクロ・コロニー形成のパラメータ値

| Culture age (days) | Microcolony size (i) | λ (h^{-1}) | t_r (h) | N_{00} (%) |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------|--------------|-----------------|
| 0.3 | ≥ 2 | 5.27 | 0.44 | 100.0 |
| | ≥ 4 | 4.03 | 1.44 | 100.5 |
| | ≥ 8 | 3.23 | 2.45 | 101.6 |
| 1 | ≥ 2 | 2.02 | 2.47 | 96.5 |
| | ≥ 4 | 2.43 | 3.58 | 92.9 |
| | ≥ 8 | 1.96 | 4.55 | 91.6 |
| 4 | ≥ 2 | 1.16 | 2.83 | 61.8 |
| | ≥ 4 | 1.05 | 3.79 | 59.7 |
| | ≥ 8 | 1.16 | 4.87 | 59.3 |
| 7 | ≥ 2 | 0.84 | 2.81 | 55.7 |
| | ≥ 4 | 0.63 | 3.73 | 55.2 |
| | ≥ 8 | 0.67 | 5.16 | 54.3 |
| 10 | ≥ 2 | 0.33 | 2.89 | 31.0 |
| | ≥ 4 | 0.25 | 3.77 | 29.9 |
| | ≥ 8 | 0.17 | 4.62 | 33.6 |

第3章 遅滞期から対数期を通じた細胞集団の増殖

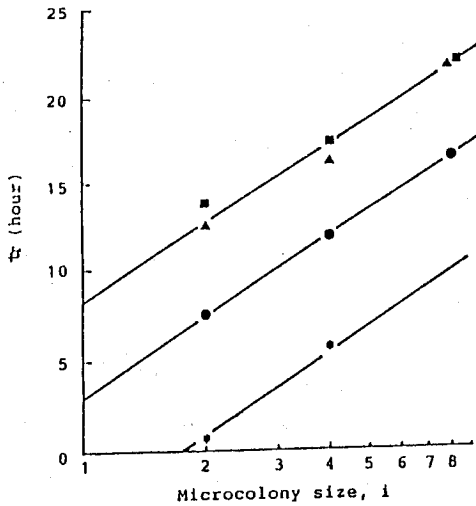


図7 単雑菌 S2012のマイクロ・コロニーの大きさと t_r 値。接種した親細胞の培養齢が0.9日 (*)、7.0日 (●)、22.0日 (▲)、28.0日 (■)。

本章では、FORモデルの考え方が液体培地中でも当てはまり、遅滞期から対数期を通じた細胞集団の増殖過程を、このモデルのパラメータを用いて定量的に解析できることを検証する。

Buchananは1918年に、細菌細胞集団の増殖モデルを提案した。彼のモデルでは、新しい培地に接種した親細胞は、ある確率分布にしたがって増殖を開始し、一度増殖を開始

した細胞は一定の速度で増殖を続ける、と仮定している。しかしながら、Buchananの用いた確率分布関数は、7個のパラメータを含む複雑な式のため、各パラメータのもつ意味付けを明らかにし、その値を算出することは困難である。これに対し、式(1)は3個のパラメータよりなり、さらに各パラメータのもつ意味付けは明かである。そこで、式(1)をBuchananの用いた確率分布の代わりに用いて細菌の増殖の理論式を誘導し、この式と細菌の増殖曲線を比較した。

親細胞が増殖期にあった場合、培養 t 時間後の全生菌数 n は次式で表わされる。

$$n = N_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

ここで、 μ は比増殖速度である。親細胞が定常期から死滅期にかけての非増殖期にあった場合は、初めに遅滞期が観察された後、対数増殖を開始する。このとき、遅滞期の長さ L は、次式で表わされる。

$$L = t_r(2) + \frac{1}{\mu} \ln \left(\frac{\mu + \lambda}{\lambda} \right) \quad (4)$$

*E. coli*の増殖期にあった親細胞を接種すると、生菌数は遅滞期無しに対数的に増加した(図8)。非増殖期にあった親細胞を接種すると、生菌数は遅滞期の後に対数的に増加した(図8)。これらの観測値は、実線で示した理論値とよく一致した。従って、FORモデルは、液体培地中における細菌の増殖にも当てはまると考え

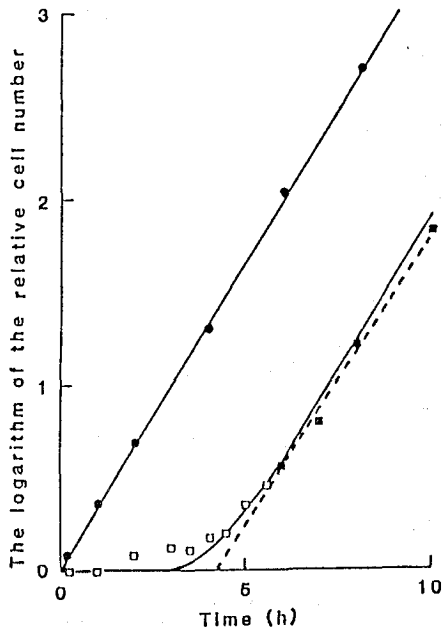


図 8 液体培地中における *E. coli* の増殖曲線。接種した親細胞の培養齢は、0.3 日 (●)、10 日 (□、■)。実線は理論曲線。

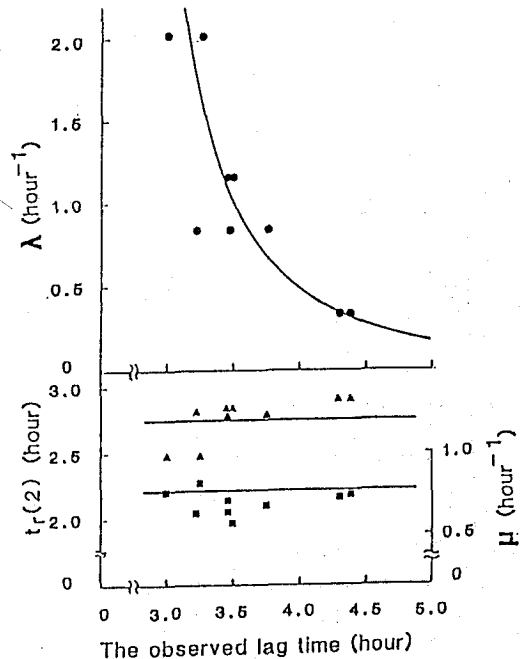


図 9 *E. coli* の遅滞期と、3つのパラメータ、 λ (●)、 $t_r(2)$ (▲)、 μ (■) の関係。

られる。*E. coli* の場合、 $t_r(2)$ と μ の値はわずかな変動しか示さなかった。したがって、遅滞期の長さは λ の値で決まる (図 9)。

第4章 種々の細菌のパラメータ t_r に基づいた類別

本章では、土壤細菌を中心にコロニー形成を検討し、どのような増殖特性を持った細菌が存在するのかを、 t_r 値を中心に解析することを目的とする。

供試した細菌は、水田土壌より単離された細菌25株と *E. coli* の26株である。これらの細菌は、nutrient broth (NB 培地) で生育する細菌 (NB 細菌) 4 株と、1/100 nutrient broth (DNB 培地) では生育するが、NB培地では生育阻害を受け

図10 NB細菌に属する *E. coli* を培地中で長期間保存した際の、FOR モデルのパラメータ値の変化。

図11 DNB 細菌に属する *Agromonas* sp. (S711) を培地中で長期間保存した際の、FOR モデルのパラメータ値の変化。

図12 DNB 細菌に属する単離菌 (S2012) を培地中で長期間保存した際の、FOR モデルのパラメータ値の変化。

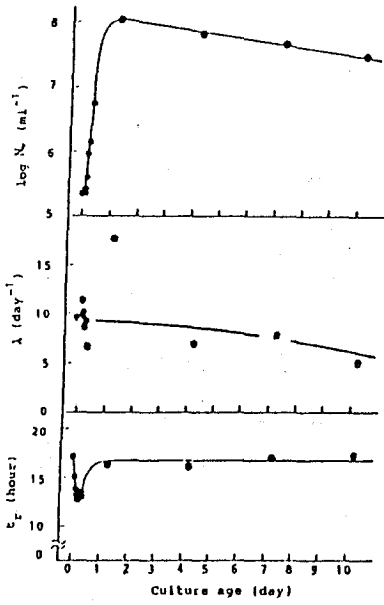


图10

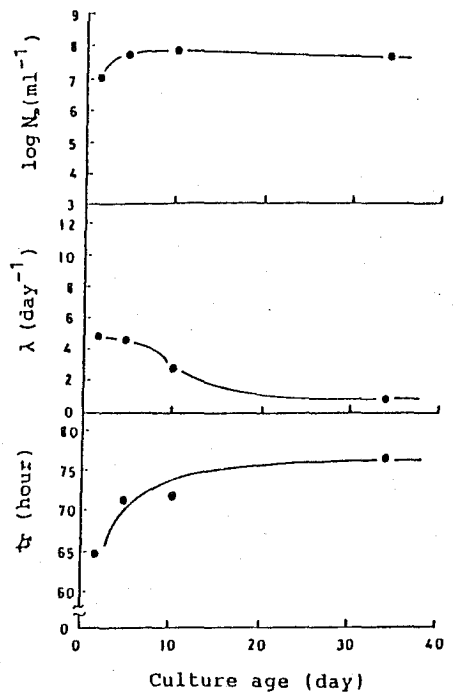


图11

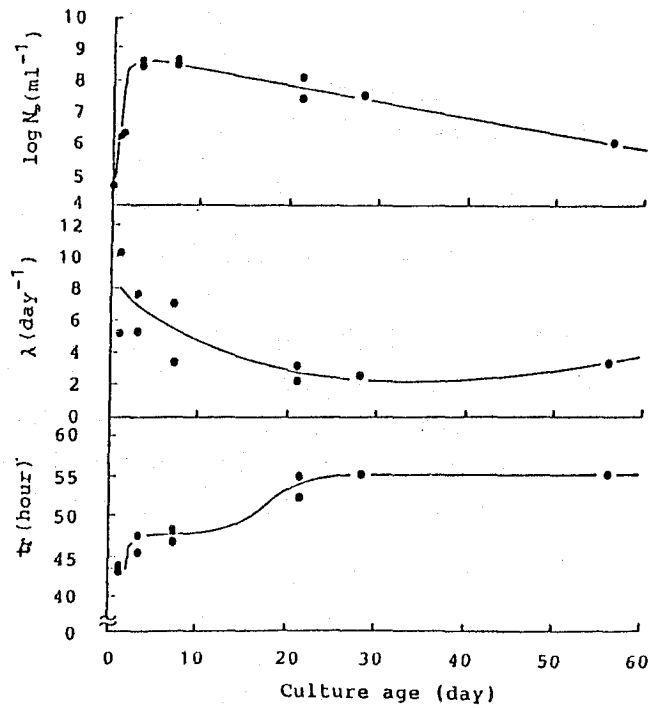


图12

る細菌 (DNB 細菌) 22株であった。これらの細菌より培養の異なる時期にサンプルを取り出し、各サンプルを用いて混釈寒天平板を作成し、肉眼でコロニーの形成を観察した。図10,11,12に、3株の細菌について、接種した親細胞の培養齢の増加にともなうFOR モデルのパラメータの変動パターンを示した。

パラメータ λ 値は親細胞の培養期間が長いほど小さくなった。これは、親細胞の培養齢が古くなるにつれてその増殖開始速度が小さくなったため、この値により大きく影響されるコロニー出現速度 λ の値も小さくなったためと考えられる。

パラメータ t_r は、細菌の増殖を反映しているパラメータである。 t_r 値の変動パターンを整理すると、(i) 使用したすべての供試菌の t_r 値は、増殖期から定常期にかけて増加した。(ii) 供試した全てのNB細菌の t_r 値は、定常期から死滅期の間わずかな変動を示しただけであった。(iii) DNB 細菌22株は、 t_r 値が定常期から死滅期にかけてわずかな変動しか示さなかった15株と、培養が古くなると大きく変動した7株より構成されていた。

t_r 値は、接種した親細胞が増殖を開始するまでの待ち時間と、コロニーが肉眼で観察し得る大きさになるまでの時間に分けることができるが、後者は接種した親細胞の培養齢が古くなっても変動しないと考えられる。図12に示した単離菌 (S2D12) は、培養齢が10日の時の t_r 値に比べ20日以降の時の t_r 値は6-7時間増加した。この増分は、同じ単離菌の、図7に示したY-切片の増分とほぼ一致した。従って、コロニー形成の t_r 値の変動は、接種した親細胞が増殖を開始するまでの時間が培養齢の増加とともに変動するためであると考えられる。

本研究では、培養時間と出現してくるコロニー数の関係を解析することにより、土壌から単離された、低栄養で増殖するDNB 細菌の中に、増殖を開始するまでの時間が増加する株を見いだした。これらの細菌は、増殖が停止した状態に長期間おかれると、真核細胞における G_0 期に相当するような休止期に入ると考えられる。このような休止期に入った細胞が増殖期に移るためには細胞の生理状態を変える必要があるため、増殖を開始するまでの時間が増加すると考えられる。今後、このような低栄養細菌に観察された休止期に関する研究が必要であると考えられる。

まとめ

細菌細胞が増殖を開始し、細胞分裂を続ける現象について研究し、次の点を明らかにした。

- (1) 細菌細胞をマイクロ・カルチャー上に接種し、親細胞の分裂する過程を解析した。その結果、親細胞はFOR モデルにしたがって増殖を開始し、いったん増殖を開始した親細胞は一世代時間の後、分裂することを明らかにした。
- (2) 各クローンの増殖をFOR モデルを用いて解析し、一度増殖を開始した細胞は、ほぼ同一の世代時間で分裂を続けることを明らかにした。
- (3) FOR モデルより誘導した細菌の増殖式が液体培地中における細菌の増殖曲線と一致すること示した。
- (4) *E. coli* と土壌から単離した25株の細菌のコロニー形成を、FOR モデルの立場から解析した結果、接種した親細胞の培養齢の変化にともなうパラメータの変動パターンより2つのグループに分けられることを示した。

以上の結果は、その多くが非増殖状態にある土壌中の細菌細胞の活動性を解明する上で重要な意味を持つと考えられる。

審査結果の要旨

土壌中の細菌の多くは、非増殖状態にある。これらの細菌がどのようにして増殖を開始し、その後分裂を続けていくか、この問題は土壌中での細菌の活動をコントロールする上で重要な意味をもっている。本研究は、顕微鏡下のマイクロ・カルチャー法と平板上でのコロニー形成法とを用いて、この問題の解明を行った。

まず、マイクロ・カルチャーにおいて、単離細菌が最初の分裂をどのような時間経過で起こすかを解明した。その結果、*E. coli*および*Agromonas sp*は、非増殖状態にある細胞を用いた場合、培養開始後ほぼ一代時間後分裂が始まり、一次反応的に接種細胞が分裂を起こしていくことを認めた。一方、他の単離細菌S 2 D12は、世代時間+6時間後に同様な分裂をみせる場合が世代時間後に分裂をみせ始める場合とがあることを認めた。このことから非増殖状態の細胞には、増殖開始後直ちに分裂過程に入れる v -phaseと開始後一定の内部変化の後、分裂過程に入る g -phaseとがあることを推定した。

次いで、一度分裂した細胞のその後の細胞分裂経過を研究し、いずれの場合も、ほぼ一定の世代時間で分裂をつづけることを認めた。すなわち、 v 、 g 両phaseの細胞とも、増殖によって同一の分裂細胞となることをしめした。

細胞の増殖開始が一次反応的に進行する事実は、液体培養における誘導期の解析にも重要な視点をあたえる。本論文の第3章ではこの問題を扱い、誘導時間を増殖開始反応の速度によって表現できることを示した。

第4章では、手板上のコロニー形成の観点からも、 v 、 g 両phaseの存在が認められることを示し、多数の土壌からの単離菌について検討した結果をまとめている。

本研究は、以上のように土壌中の細菌にとって重要な非増殖状態から増殖状態への移行の問題について、新しい解析研究の基礎を築いたといえる。よって審査委員一同は著者に農学博士の学位を授与するに値すると認定した。