

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17975

研究課題名(和文) 微小空間における細菌集団の挙動計測と制御

研究課題名(英文) Measurement and control of the group of bacteria in a confined region

研究代表者

中井 唱(Nakai, Tonau)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80452548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：遊泳細菌の密集時に起きる集団運動の発生メカニズムの理解と運動の制御を目指した研究を行った。(1)マイクロマニピュレータを用いて極細ガラス棒を操作することにより、寒天培地上に大きさ数十 μm 程度の円形プールを作成し、細菌の集団運動を閉じ込めることに成功した。(2)誘引物質を充填した毛細管の先端に細菌が集積する様子を観測した。誘引物質に近づく方向に遊泳する時は、細菌の方向転換の頻度が下がる(0.5 Hz → 0.3 Hz)。(3)集団運動する細菌懸濁液に微粒子を混合し、微粒子の動きと周りの細菌の動きとの関係を調べた。微粒子の平均二乗変位はブラウン運動とは異なり、時間間隔の1.7-1.8乗に比例する。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to understand mechanism of the collective motion in a dense suspension of swimming bacteria and to control the collective motion. Results are as follows: (1) collective motion of bacteria can be confined in a circular pool on an agar medium with the size of 10 micrometers, which is made with ultrafine glass needle operated by a micromanipulator. (2) Accumulating bacteria around the tip of a capillary with an attractant were observed. When a cell swims toward the attractant, frequency of the tumble of a cell decreases (from 0.5 Hz to 0.3 Hz). (3) Motion of microbeads in the bacterial suspension was analyzed. The mean square displacement (MSD) of the microbeads is different from Brownian motion in the sense that the time exponent of the MSD is 1.7 - 1.8, whereas that of a Brownian particle is exactly 1.

研究分野：バイオ流体力学

キーワード：細菌 ベン毛 集団運動 走化性

1. 研究開始当初の背景

微生物は自然環境のサイクルにおける分解者としての役割や発酵食品の生成など、古来より人類の生活を支えてきた。近年、これら微生物群を積極的に利用し、環境改善・食品加工・新たなエネルギー資源などに役立てる動きが起こっている。そのためには、効率よく微生物群の動きを制御する技術の確立が必要となる。

これまでに、微生物群の制御は走性を利用して行われてきた。光走性を利用したミドリムシ群の行動制御や、誘引物質を用いた細菌の制御が報告されている。しかし微生物群の実際の活動の場は、食品表面や内部といった、複雑に入り組んだ空間であり、すぐ近くに存在する界面の影響を大いに受けるものと考えられる。

申請者はこれまでに微生物集団の動きや時空間パターンダイナミクスを捉える研究を行ってきた。以下はこれまでに得られた知見である。

- ・遊泳細菌（大きさ数 μm ）を密集させ、細菌間の平均距離が $5\mu\text{m}$ 以下になると、数十 μm スケールの渦を伴う集団運動が起きる。
- ・2 方向からの同時観察により、界面近傍における細菌運動の三次元観測に成功した。

一方で、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術に見られるように、微細加工分野の進展は近年目覚ましく、この両者を融合させることで、微生物群の集団運動の時空間スケールを活かした効率的な制御ができるものと期待する。そこで本研究ではマイクロチャネルなど微小空間に存在する細菌集団の運動制御を目的とする。

2. 研究の目的

遊泳細菌の密集時に起きる集団運動について、発生メカニズムの理解と運動の制御を目指す。当初の具体的な目標を、以下に掲げる。

(1)細菌の集団運動の時空間スケールについて、計測と数値解析を行う。密度や速度といった物理量と集団運動の時空間構造との関係を明らかにする。これまでに集団運動の発生条件および速度相関が分かっているが、本研究ではさらなる観察と数値解析を実施し、細菌数密度と相関長との関係を明らかにする。

(2)(1)で得られた知見を基に、細菌集団を効率的に制御可能な微小流路を作成する。MEMS 技術を用いてスライドガラス上に微小流路を作成する。流路上に細菌の集団運動を発生させ、渦構造の特徴的な時空間スケールの流路壁面の影響による変化を確認する。

(3)細菌の誘引物質・忌避物質を流路に配置し、集団運動の制御効率について検討する。

3. 研究の方法

実施した研究内容について、方法を述べる。

(1)細菌の集団運動の微小空間への閉じ込め

細菌は枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を用いた。培養には LB 培地を用い、寒天を加え加熱したものをシャーレ（直径 90 mm, 深さ 15 mm）に厚さ 3-4 mm 程度流し込み、冷却し固める。細菌の集団運動は半流動培地上が適しており、寒天濃度は 0.6 wt% とした。培地上に菌を接種した後シャーレに蓋をし、37 環境下で 3 時間程度培養すると、接種箇所のコロニーが広がり集団運動が発生する。

顕微鏡観察時はシャーレの蓋を外すため、寒天内水分の蒸発に伴い集団運動の速度は遅くなり、やがて止まってしまう。そこで、ガラス棒を用いて寒天内の水分を培地表面に溜め、この部分でのみ集団運動を生成する方法を考案した。ガラス棒 (GD-1000, ナリシゲ) をプーラー (PC-20, ナリシゲ) で引き伸ばし、先端の太さが数 μm の針を作成し、これを倒立顕微鏡 (IX71, オリンパス) に取り付けたマイクロマニピュレータ (ON3-99D, ナリシゲ) を用いて操作する。図 1 の模式図に示すように、針先が培地上に触れると表面張力により培地内の水分がガラスの接触部に集まり、直径数十 μm の円形プールができる（実物は図 2 参照）。このプールを、マニピュレータを用いて細菌集団の近くに移動させると、培地上の細菌がプールへ引き寄せられ、遊泳を行う。観察および記録は対物レンズ (LUCPlanFLX40, オリンパス) とデジタルカメラ (DP27, オリンパス) を用い、映像を PC に保存した。透過光照明による明視野観察のためべん毛は見え、可視化できるのは細長い菌体のみである。

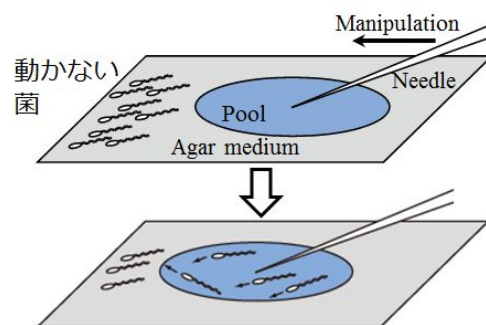


図 1 : 微小針操作による細菌群の閉じ込め。

(2)誘引物質存在下での細菌の遊泳特性調査

サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* SJW1103 を LB 液体培地で培養した。誘引物質にはセリン（アミノ酸の一種）を用い、走化性の試験は、capillary assay（極細の毛細管の中に寒天で固めた誘引物質を充填し、先端から拡散する誘引物質への応答を観測する）により行った。

倒立顕微鏡 (Olympus IX71) を用いた位相差観察 (対物レンズ: Olympus LUCPLFLN40XP) を行った。デジタルカメラ (Olympus DP27) により PC に動画を保存し、運動解析ソフトウェア (ディテクト DippMotionPro) を用いて菌体の位置を計測した。

(3) 細菌の集団運動中の微粒子の運動解析 観察

細菌は枯草菌 *Bacillus subtilis* を用いた。直径 90 mm のプラスチック製シャーレに厚さ約 3~4 mm の LB 半流動培地 (寒天濃度約 0.6 wt%) を作成し、培地上の中央に細菌を点接種した。その後 30 日の環境で 8~12 時間培養させるとコロニーは数 mm の大きさに成長し、その中には細菌は集団運動を行っている。

微粒子は直径 4 μm 、比重 1.02 の球形ナイロンパウダー (KANOMAX 社) を用いた。水中に分散させたナイロンパウダー (40 g/L) を集団運動を行う細菌コロニーの上に、10 μL 滴下した。

観察には倒立顕微鏡 (OLYMPUS IX71) を用いた。対物レンズは、微粒子の位置取得の際は 10 倍 (OLYMPUS UPlanFL10X)、微粒子周囲の細菌の撮影には 50 倍 (OLYMPUS SLMP1anN50X) を用いた。映像は、CCD カメラ (OLYMPUS DP27) を用いて 30 fps、1216 x 960 pixel で取得し、PC に記録した。結露による視界不良を防ぐため観察時はシャーレの蓋を外した。水分の蒸発に伴い集団運動の速度が低下するため、映像の記録はおよそ 1 分以内に行った。

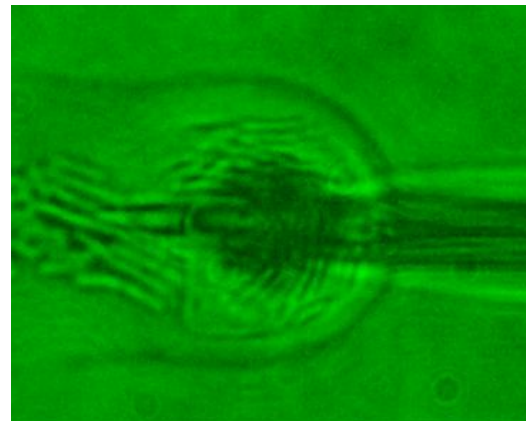
解析

微粒子の位置の計測は自動追尾ソフトウェア (ディテクト DippMotionPro) により行った。集団運動における個々の細菌の運動は、フリーソフト ImageJ を用いて目視により計測した。集団運動においては細菌が重なるほど密集しており、細菌単体の自動追尾ができない。得られた微粒子の位置座標から、平均二乗変位 (Mean Square Displacement, MSD) を算出した。ある決まった時間間隔 t の間に移動した直線距離を L とすると、MSD はある微粒子の運動における同一の t に対応するすべての L について、二乗の平均をとったものである。

4. 研究成果

(1) 細菌の集団運動の微小空間への閉じ込め
寒天培地上に大きさ数十 μm 程度の微小な円形プールを作成し、プール内での細菌の集団運動を観測した。プール内に密集する細菌群は図 2 に示すように菌体の向きが揃っており、プールの円周に沿った方向の集団運動が見られる。この細菌群を、マニピュレータを用いて培地上を運ぶとプール内の細菌が少しずつ培地上に取り残されていき、細菌数密度

が低い状態となる。この状態では個々の細菌は自由な方向に遊泳を行い、集団運動は見られない。このことから、同一の細菌群の数密度が低下することにより、遊泳方向の揃った集団運動から個々のランダムな方向の遊泳運動へと変化することが分かった。



↓ 寒天上を搬送

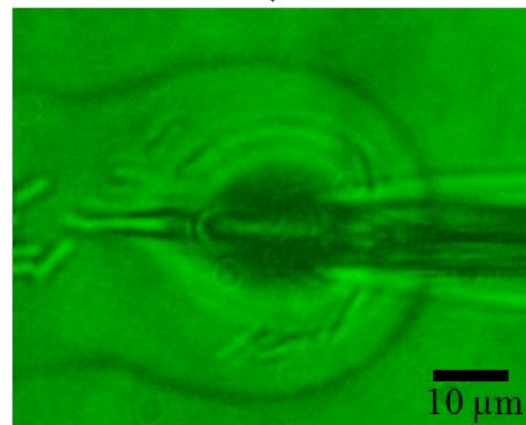


図 2 : 円形プール内での細菌集団の挙動。

(2) 誘引物質存在下での細菌の遊泳特性調査
誘引物質 (セリン) を充填した毛細管の先端に細菌が集積する様子を観測し、細菌の速度や方向転換の頻度や角度分布などを調査した。毛細管を配置後 10 分程度で誘引物質の周囲 100 μm の範囲に細菌が集積する。

細菌は遊泳時には複数のべん毛を束にしてているが、突然束を解いて方向転換し、また別の方向に泳ぎ始めることが知られている。この方向転換の頻度が誘引物質の有無によりどのように変化するかを計測した。図 3 に、同一細菌の連続する 2 回の方向転換間の時間 (直進を続ける時間) の分布を示す。遊泳時の誘引物質の濃度勾配が正 (誘引物質に向かって遊泳する) の時は、直進を続ける時間が長くなる。つまり誘引物質の存在下では、細菌の方向転換の頻度が下がる (平均値で 0.5 Hz → 0.3 Hz) ことが分かった。

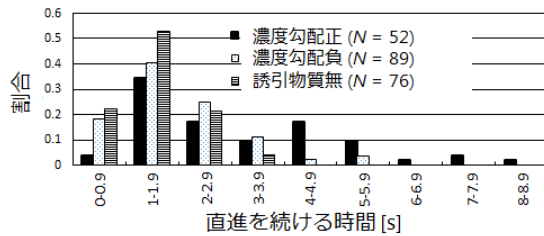


図3：誘引物質（セリン）の有無による細菌の方向転換頻度の違い。

(3)細菌の集団運動中の微粒子の運動解析

細菌の集団運動によって動かされる微粒子はブラウン運動の様なふらふらした軌跡を描く。

図4に、5つの微粒子についての平均二乗変位（MSD）を示す。微粒子が完全にランダムなブラウン運動の場合は、MSDは時間間隔 t に比例し、等速直線運動の場合は t の2乗に比例する。図4のように両対数プロットをとり直線の傾きを調べることで、MSDが t の何乗に比例するかが分かる。

ピーズにより MSD の大きさに差があるが、いずれも t が 0.1 秒から数秒の範囲では MSD は t の 1.7 -- 1.8 乗に比例する。 t が数秒より大きくなると、MSD の傾きが徐々に小さくなり、1 に近づく。細菌の集団運動の特徴的時間スケールが数秒であり、これよりも長い時間における MSD は、時間に比例するランダムウォークに近づくことと推測できる。なお、微粒子が細菌集団の流れに沿って運動する場合、双方の速度はほぼ同じである。

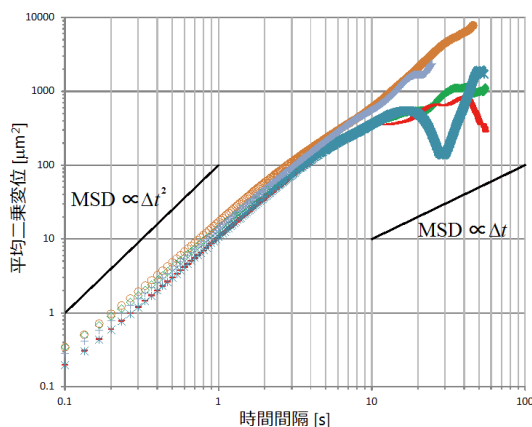


図4：細菌の集団運動中に混合した微粒子の平均二乗変位。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計3件)

Tomonobu Goto, Tonau Nakai, "Steady distribution of cells in a one-dimensional biased random walk model of bacterial chemotaxis", Journal of Biomechanical Science and Engineering Vol. 11, No. 2, Paper No.15-00587 (9p.) (2016) DOI: 10.1299/jbse.15-00587, 査読有。

Tonau Nakai, Yoshihiro Mouri, Tomonobu Goto "Analysis of the velocity correlation in the collective motion of bacteria", Journal of Aero Aqua Bio-mechanisms Vol. 4, No. 1, pp.32-36 (2015), 査読有。
https://www.jstage.jst.go.jp/article/ja_bmech/4/1/4_32/_pdf

Tomonobu Goto, Tonau Nakai, "A One-dimensional Discrete Model of Biased Random Walk Relating to Bacterial Chemo-taxis", Journal of Aero Aqua Bio-mechanisms Vol. 4, No. 1, pp.18-24 (2015), 査読有。

https://www.jstage.jst.go.jp/article/ja_bmech/4/1/4_18/_pdf

〔学会発表〕(計19件)

中井唱, 角田裕介, 後藤知伸, "高密度の細菌懸濁液における微粒子の運動と周囲の細菌運動との関係", 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2017, 2017/05/12, ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)。

吉野純平, 梶谷真未, 中井唱, 後藤知伸, "サルモネラ菌の方向転換における走化性の影響", エアロ・アクアバイオメカニクス学会第36回定例講演会, 2017/03/21, 千葉大学西千葉キャンパス(千葉県千葉市)。

梶谷真未, 吉野純平, 中井唱, 後藤知伸, "誘引物質のまわりに集まるサルモネラ菌の分布の時間変化", 日本機械学会中国四国学生会第47回学生員卒業研究発表講演会, 2017/03/06, 広島工業大学五日市キャンパス(広島県広島市)。

中井唱, 後藤知伸, "密集した遊泳細菌がつくる渦構造の計測および微小領域における挙動", 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会, 2017/01/19, ウィンクあいち(愛知県名古屋市)。

Tomonobu Goto, Tonau Nakai, "A discrete biased random walk model based on bacterial chemotaxis", The 24th

International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, ICTAM2016, 2016/08/23, モントリオール (カナダ).

Tonau Nakai, Yoshihiro Mouri, Tomonobu Goto, "Observation and Numerical Simulation of the Spatio-Temporal Structure in the Collective Motion of Bacteria", The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP Biomech 2015), 2015/09/18, 北海道大学札幌キャンパス (北海道札幌市).

後藤知伸, 中井唱, "細菌の集団運動により生成される流動パターンの可視化", 可視化情報シンポジウム ワークショップセッション「生物の生きる知恵と流体工学」, 2015/07/22, 工学院大学 (東京都新宿区).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.damp.tottori-u.ac.jp/~lab5/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 唱 (NAKAI, Tonau)

鳥取大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80452548