

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22740249

研究課題名（和文） 大腸菌のミクロな振舞いと集団的パターン形成を繋ぐ階層的秩序形成の理解

研究課題名（英文） Hierarchical order by a relation Between self-propelled motion of individual E. coli and its macroscopic pattern

## 研究代表者

櫻井 建成（SAKURAI TATSUNARI）

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：60353322

## 研究成果の概要（和文）：

個々の大腸菌の動きの観察を行い、平均移動距離を見積もることにより、大腸菌の有効拡散係数を求めた。その結果、走化性大腸菌の有効拡散係数は栄養濃度に依存しないこと、走化性のない大腸菌はその伝搬速度に依存して有効拡散係数が変化していることを実験的に示した。上記の結果を加味した数理モデルの提案を行い、大腸菌パターン形成におけるマクロな秩序形成に関する一部の実験結果を再現することに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

The effective diffusion coefficient of E. coli was estimated by measuring the mean square displacement of an individual E. coli having chemotactic and non-chemotactic receptor under the different initial condition. As a result, the effective diffusion coefficients of chemotactic cells in different initial concentrations of nutrient are not different, while the coefficients of non-chemotactic cells are depended on the speed of propagation front. The proposed numerical model including above experimental features, represented a macroscopic manner of E. coli pattern.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学、数理物理・物性基礎

キーワード：化学物理、数理物理、非線形科学

## 1. 研究開始当初の背景

自然界の森羅万象に見られる多くの深遠な現象の理解には、ミクロからマクロにいたる多重の階層構造と各階層で観測される秩序(リズムやパターン)の形成、発展、消滅、

再生の反映を理解する必要がある。研究代表者は、生体組織のような興奮性媒体を構成することができる Belousov-Zhabotinsky (BZ) 反応を用いた時間空間的秩序に興味を持ち、フィードバック機構を利用した秩序構

造の制御について実験・数値実験的に研究を行ってきた。ところで、BZ 反応は化学反応と化学物質の拡散(反応拡散系)の結合として捉えられている。一方、多くの自然現象では物質の移動を伴う流体現象を含んでおり、近年では、反応拡散移流系における数値実験や解析の研究が盛んに行われている。物理・化学から見た時間空間的秩序形成の問題に対し、生命現象に見られるリズムやパターンの生成の類似性から、実験、数値実験、理論解析など多くの研究が行われている。しかしながら、実際の生命現象、もしくは、生物を用いた実験との間にはいまだに大きな壁がある。

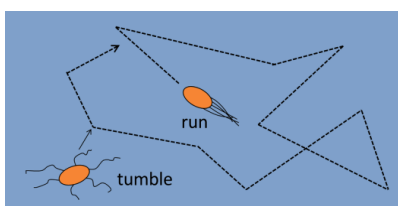


図 1 : 大腸菌の鞭毛を使った 2 種類の運動 (run と tumble) およびその時の大腸菌の形態の概略図。

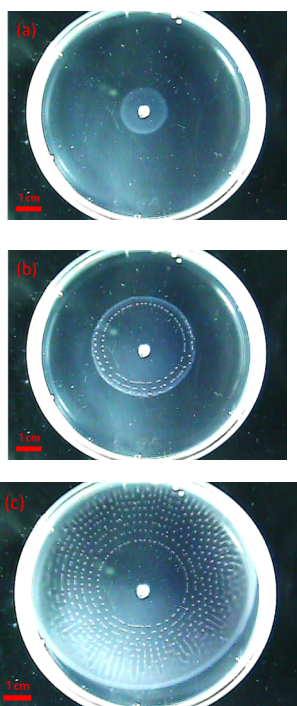


図 2 : 大腸菌のマクロなパターン形成。(a-c) 寒天濃度 0.2%, 栄養素(コハク酸)濃度 3mM の寒天培地に走化性大腸菌の伝搬する波頭と波頭からドットを形成していく様子。それぞれ植菌から (a) 25 時間後、(b) 40 時間後、(c) 75 時間後。

さて、マイクロからマクロな現象を繋ぐ研究としてブラウン運動が有名である。個々のブラウン粒子の動き(ランジュバン方程式)から統計的手法を用いてマクロな現象(拡散方程式)としての記述ができる。大腸菌の遺伝子や蛋白レベルのマイクロな現象から、メソスコピックな細胞個々の動き(例えば、tumble と run の繰り返しによるランダムウォーク: 図 1)と細胞間の相互作用、そして、集合した時のマクロな振舞の違があることは知られている(例として図 2 に示すような伝搬する波頭とその後ろで大腸菌クラスタを作るパターン形成)。それぞれの階層で観測される秩序形成は良く研究されているが、大腸菌の振舞についてマイクロからマクロを物理的に繋ぐ研究は少ない。

## 2. 研究の目的

従来、非線形科学を基礎とした秩序形成の分野で培われたノウハウを発展させ、マイクロからマクロを繋ぐ階層的秩序構造を扱い、大腸菌のパターン形成における階層的秩序の発生メカニズムを理解することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) アスパラギン酸に対して走化性を持つ大腸菌、および、走化性を持たない大腸菌による伝搬するマクロなパターンの波頭伝搬速度の計測。

大腸菌のパターン形成において伝搬するフロント(波頭)が観測される。その波頭の伝搬速度の初期条件依存性の観測を行う。

(2) 初期栄養濃度を変数とした個々の大腸菌の動きの観測によるマクロな物理量である有効拡散係数の同定。

アスパラギン酸に対して走化性を持たない菌株の大腸菌が水中を遊泳する場合、もしくは、走化性を持った菌株であっても、遊泳する水中にアスパラギン酸の濃度勾配が存在しない場合、Run 時の平均速度は約 20  $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、Run 状態の平均持続時間(Tumble の平均時間間隔)は 0.83 秒であり、Tumble での方向転換の角度はランダムに選ばれることが知られている(図 1)。したがって大腸菌はランダムウォークのような運動を見せる。そこで、条件を変えた場合の有効拡散係数を求める。

## (3) 数値モデルの提案。

反応拡散移流系として考えられ、本現象を理解するための反応拡散移流モデルもいくつか提案されている。その多くが、活性な大腸菌の密度、不活性な大腸菌の密度、培地中の栄養素の濃度、培地中の誘引物質(アスパラギン酸)の濃度などを変数としたものであ

る。そして、反応項は大腸菌の増殖や誘引物質の生成、分解などの効果を、拡散項は大腸菌の鞭毛を使った遊泳や化学物質の拡散の効果を、移流項は大腸菌が誘引物質に引き寄せられる効果をそれぞれ表している。現在提案されている数理モデルには、うまく本現象を再現している点と、本現象を再現できていない点とがそれぞれ存在する。本研究課題で得られた実験結果をもとに数理モデルの改良を行い、大腸菌パターン形成の理解を進める。

#### 4. 研究成果

(1) 走化性大腸菌、および、走化性のない大腸菌による波頭伝搬速度の計測。

(1-1) 走化性大腸菌波頭伝搬速度の計測。

エサの初期濃度として、コハク酸の濃度を 10 mM とした場合の走化性大腸菌波頭の様子を図3に示す。図3の時空間プロットにおいて、波頭は一定速度で伝搬していることがわかる。また時空間プロットにおける波頭の傾きより伝搬速度を見積もることができる。

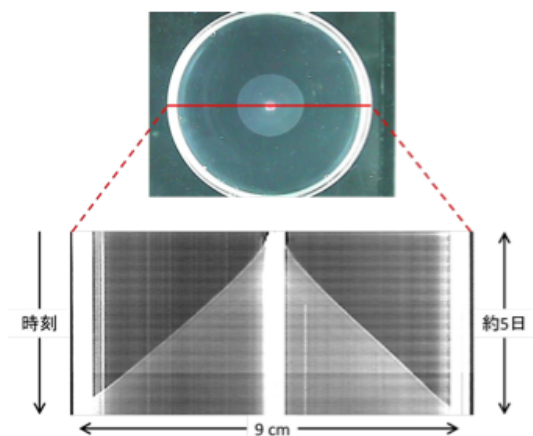


図3：伝搬するフロント（波頭）の様子（上図）と走化性大腸菌の広がる様子の時空間プロット（下図）。寒天培地中の寒天濃度は 0.2 %、栄養素（コハク酸）濃度は 10 mM。縦軸は時間であり、時間は上から下が正の方向である。横軸は空間であり、上図中の赤い直線での断面が時空間プロットの横幅と対応している。

(1-2) 走化性のない大腸菌の波頭伝搬速度の計測。

エサの初期濃度として、コハク酸の濃度を 6 mM とした場合の走化性のない大腸菌波頭の様子を図4に示す。図4の時空間プロットから、実験開始4日間ぐらひは一定速度で伝搬しているが、その後速度が変化している様子（一定速度であるが、速度が速くなっている）が分かる。ここでは、波頭の伝播速度が変化する前の領域を領域 I、変化した後の領域を領域 II とする。

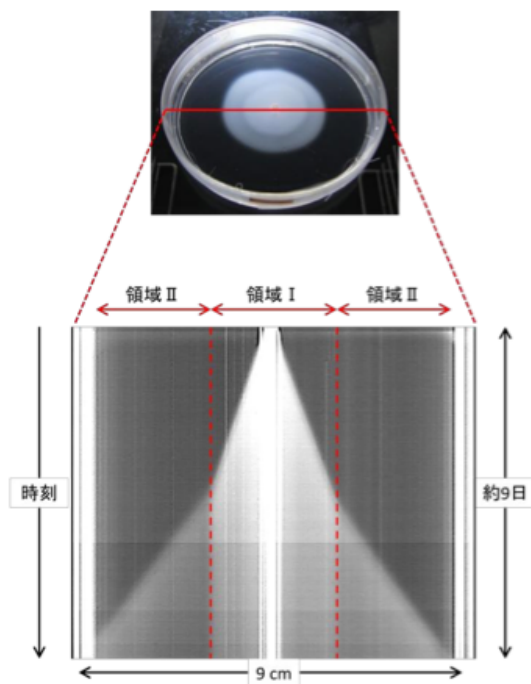


図4：伝搬するフロント（波頭）の様子（上図）走化性のない大腸菌の広がる様子の時空間プロット（下図）。寒天培地中の寒天濃度は 0.2 %、栄養素（コハク酸）濃度は 6 mM。縦軸は時間であり、時間は上から下が正の方向である。途中でフロント（波頭）の伝播速度が変化している様子が見られる。フロント（波頭）の伝播速度が変化する前の領域が領域 I、変化した後の領域が領域 II とする。

(1-3) 波頭伝搬速度のコハク酸初期濃度依存性。

コハク酸初期濃度（初期栄養濃度）を変えて行った場合のそれぞれの実験結果を図5に示す。図5より、走化性大腸菌による伝搬するマクロなパターンの波頭伝搬速度（図5中◆）は、コハク酸初期濃度と負の相関があることが分かった。従来提案されている大腸菌パターン形成における数理モデルでは、初期栄養濃度に対して正の相関がみられる。また、通常の反応拡散移流モデルにおいても同様の傾向がみられており、数理モデルの改良が必要である。

走化性のない大腸菌の波頭伝搬速度（図5中◆および◆）は、コハク酸初期濃度に正の相関がある（もしくはほとんど依存しない）ことが分かった。またその伝搬速度は同一の条件にも関わらず、領域 I（実験開始4日間ぐらひ）と領域 II（それ以降）で、それぞれ、伝搬速度が変わることが分かった。ここで、各コハク酸初期濃度において、領域 II の方の伝搬速度が速いことが分かる。同一の条件にも関わらず、波頭の伝搬速度が変化することは、従来報告されていない。

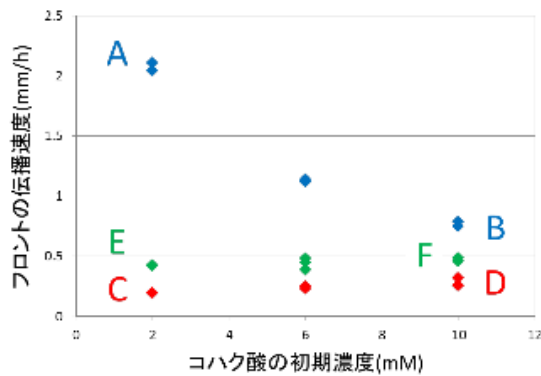


図5：実験における、寒天培地中の栄養素濃度とフロントの伝播速度との関係。寒天培地中の寒天濃度は0.2%とした。◆は走化性のある菌株、◆は走化性のない菌株の領域I、◆は走化性のない菌株の領域IIをそれぞれ表す。

(2) 有効拡散係数の同定。

個々の活性化状態の大腸菌を観察するため、円状に伝搬する波頭のすぐ外側にいる大腸菌を倒立顕微鏡により観察した。観測した様子を図6に示す。図7に、図5のA-Fの条件における実験結果を示す。それぞれの平均二乗変位(MSD)は図6(b)の軌跡より移動平均することにより求めた。それぞれのグラフにおいて、1本の線が1つの個体に関するデータを表している。一見して分かるように、図7のグラフ中の線の傾き(拡散係数に相当するような量)に大きなばらつきが見られる。次に、図8に図7より求めた有効拡散係数のヒストグラムを示す。図6(b)の軌跡からも分かるように、数十秒という短い時間内では、比較的まっすぐな経路を選びやすい個体や頻繁に向きを変える個体などがある。そのばらつきが、図7、8に見られる分布を生んでいる。そこで、それらの平均をとることにより(図9)それぞれの条件、および、株における有効拡散係数とした。図9より、走化性大腸菌(A, B)の有効拡散係数は、初期栄養濃度に依存しないことが分かった。しかしながら、走化性を持たない大腸菌では、実験開始4日間(領域I: C, D)とそれ以降(領域II: E, F)では、個々の大腸菌の有効拡散係数が変わっていることが分かる。ただし、その有効拡散係数は初期栄養濃度にほとんど依存しない。このことは、個々の大腸菌の動き易さがマクロなパターンの波頭の伝搬速度に反映されていることを示しており、図5の実験結果を説明することができる。つまり、実験開始4日以降(領域II: E, F)では、個々の大腸菌の活動が活発になり、マクロな物理量である有効拡散係数を大きくし、伝搬する波頭の伝搬速度を速くしていると考えられる。ただし、実験開始4日以降で大腸菌が活発化する生物的理解には至っていない。

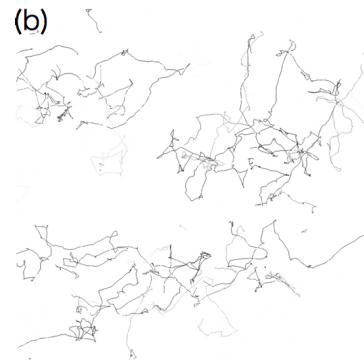
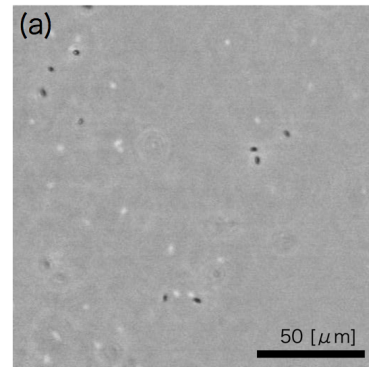


図6：大腸菌パターンの波頭付近の大腸菌の動き。(a) 顕微鏡画像。黒い(および白い)点が個々の大腸菌。(b) 個々の大腸菌の軌跡(図(a)の黒い点の重心の軌跡)。

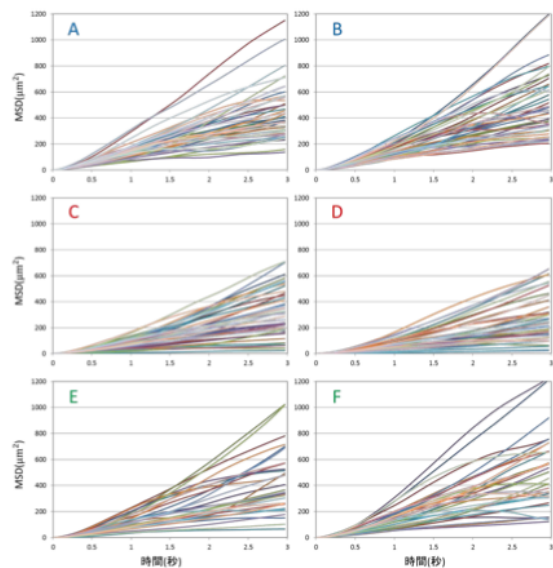


図7：図5のA-Fそれぞれの条件における、3秒間の平均二乗変位。1本の線が1つの個体に関するデータである。このグラフ中の線の傾きが、拡散係数に相当する。それぞれの線は個々の大腸菌の動きを反映したものであり、ここでは30個体の平均二乗変位を示している。

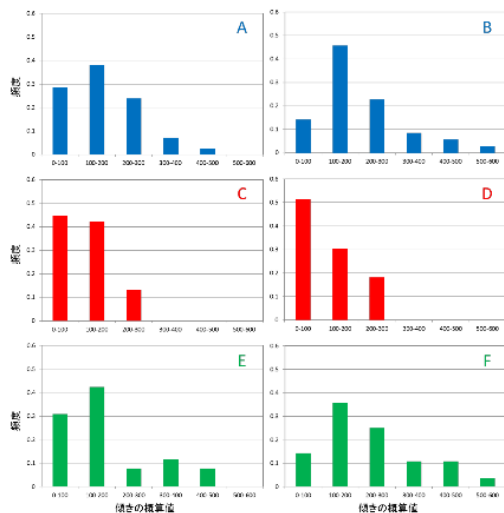


図8：図7のA-Fそれぞれの条件における、グラフ中の線の傾きのヒストグラム。

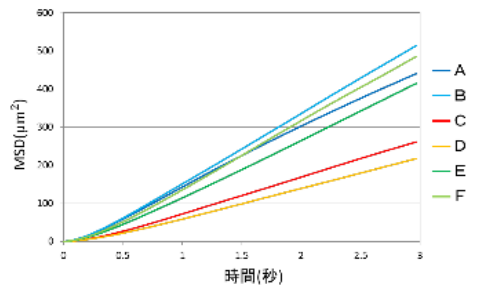


図9：図7のA-Fそれぞれのグラフ中のすべてのデータの平均。平均をとる際は、それぞれのデータの撮影時間の違いも考慮し、重みをつけている。

### (3) 数値モデルの提案。

上記の実験結果では、個々の大腸菌の動きの統計量から、走化性大腸菌の有効拡散係数は栄養濃度に依存しないことが分かった。また、大腸菌の有効拡散係数と化学物質の拡散係数の比を見積もることができた。そこで、本研究課題では、それらの結果を使った反応拡散移流モデルの提案と数値計算を行った。

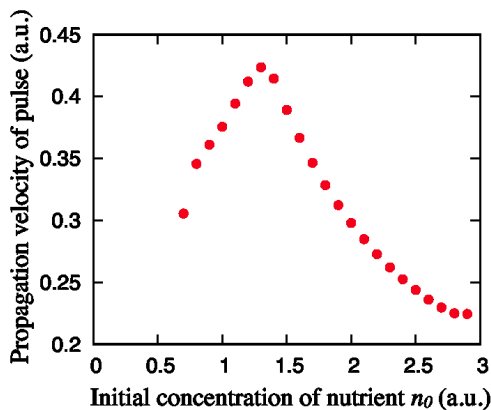


図10：反応拡散移流モデルにおける、大腸菌パターンの波頭の伝搬速度。

図10に波頭の伝搬速度の初期栄養濃度依存性を示す。本数値モデルにより、初期栄養濃度に対して正の相関がみられる領域と負の相関がみられる領域があることが分かった。負の相関がみられる数値結果はいままで存在せず、実験結果を説明することができる数値モデルの提案ができたと考えられる。しかしながら、実験結果との完全な一致はみられていない。それらは今後の課題である。

## 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1件)

① K. Kuto, K. Osaki, T. Sakurai, and T. Tsujikawa, Spatial Pattern Formation in a Chemotaxis-Diffusion-Growth Model, *Physica D* 241 (2012) pp. 1629-1639. (査読有)

[学会発表] (計4件)

① T. Sakurai, A macroscopic pattern by an individual *E. coli* in a growth-diffusion-chemotaxis system, Japanese-German Workshop “Emerging Phenomena in Spatial Patterns”, Magdeburg, Germany, Sept. 25, 2012.

② T. Sakurai, Pattern formation in a growth-diffusion-chemotaxis system, Active Dynamics on Microscales: Molecular Motors and Self-Propelling Particles, Sept. 18, 2012, Leiden, Netherlands.

③ 櫻井建成、大腸菌パターン形成研究の現状と課題、研究集会「放物型発展方程式とその応用」、2011年9月24日、大阪。

④ 櫻井建成、非線形振動子における時間リズムの生成消滅、日本時間学会第2回大会、2010年6月6日、山口。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

<http://cu.phys.s.chiba-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 建成 (SAKURAI TATSUNARI)

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：60353322

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし