

## 自然生態系における細胞外 DNA の動態と遺伝子伝播

### Dynamics and Contributions to Horizontal Gene Transfer of Extracellular DNA in Natural Ecosystems

丸山 史人, 谷 佳津治, 那須 正夫\*  
FUMITO MARUYAMA, KATSUJI TANI and MASAO NASU

大阪大学大学院薬学研究科遺伝情報解析学分野 (衛生化学) 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6

\* TEL: 06-6879-8170 FAX: 06-6879-8174

\* E-mail: nasu@phs.osaka-u.ac.jp

*Environmental Science and Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6, Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan*

キーワード: 細胞外 DNA, 遺伝子伝播

Key words: extracellular DNA, horizontal gene transfer

(原稿受付 2004年7月10日 / 原稿受理 2004年11月24日)

#### 1. はじめに

微生物が新たな環境へ適応する上で、遺伝子の水平伝達が重要な役割を果たしている。また遺伝子伝播は微生物の進化・多様化においてもその一端を担っている<sup>11,29,36)</sup>。遺伝子伝播の主な様式として、細胞またはウイルスの殻の外に存在する DNA である裸の DNA による形質転換、細胞どうしの接着により起こる接合、ウイルスに仲介される形質導入があり、20世紀半ばまでにその機構が明らかになっている<sup>22,39,40,71)</sup>。以来、これらは遺伝子導入・遺伝子組換え技術に応用され、生物学の発展に大きく寄与するとともに、有用物質の生産などを通じて我々の生活の向上に貢献している。一方、近年の遺伝情報解析技術の発展により、地理的・系統的に離れた生物種が、同じ起源を持つ遺伝子を水平伝播により共有していること、そして細菌ゲノムの中には外来遺伝子が、大きな割合で存在していることがわかってきた<sup>11,29)</sup>。これらの知見は病原微生物の抗生物質耐性遺伝子や毒素遺伝子の獲得機構を解明する上で、また組換え生物の野外利用における生態系への影響を評価する上で、遺伝子伝播を考慮することが重要であることを示している。

これまでの実験室内での研究では、三つの遺伝子伝播様式の中で、接合が最も高い頻度で伝播することが知られている。さらに系統的に懸け離れた生物種、例えば大腸菌から酵母の間での遺伝子の接合伝達が報告されている<sup>56)</sup>。一方、形質転換や形質導入は伝播頻度が接合にくらべると低く、さらにウイルスは宿主域が極めて限定されているため、自然環境中においても、これらの遺伝子伝播への寄与は小さいと考えられてきた<sup>48)</sup>。

これまでの研究は、実験室で十分な生理活性を持つ細菌を用いて行われてきた。しかし、自然環境中に生息す

る微生物の多くは、貧栄養な状態にあるため、実験室で培養した場合とは異なり、高い生理活性を保持していない。接合は細胞間での DNA の受け渡しであるため、供与菌・受容菌ともに十分な生理活性を保持している必要がある<sup>12,42)</sup>。一方、細胞またはウイルスの殻の外に浮遊している裸の DNA を受容細菌が取込む形質転換やウイルスによって仲介される形質導入では、受容細菌のみが DNA を取込む生理活性を保持していればよい。さらに環境中には、裸の DNA やウイルスが多量に存在していることがわかってきた。すなわち、環境中においてこれら形質導入および形質転換が遺伝子伝播に大きく寄与している可能性が考えられる。

本総説では細胞外 DNA、すなわちウイルスおよび裸の DNA の自然環境における現存量、存在様式、由来と役割、そして遺伝子伝播への寄与についてこれまでの研究を紹介し、今後の細胞外 DNA 研究の展開について考える。

#### 2. 細胞外 DNA の現存量と存在様式

細胞外 DNA の現存量は、河川・海洋などの水圏では 0.2-88 ng/ml<sup>12,42)</sup>、海底の堆積物においては乾燥重量 1g あたり 1 ng-31 μg と報告され、その場に生息する全細菌の DNA 量の25倍にも達することが知られている<sup>13)</sup>。また、その分子量・半減期についても多く報告がなされている (Table 1)。一方、電子顕微鏡を用いたウイルス計数法が1989年に導入され、考えられていた以上に多量のウイルスが海水中に存在していることが明らかになった<sup>4)</sup>。その後、河川、湖、海洋、土壌、堆積物等の自然環境におけるウイルスの現存量が電子顕微鏡を用いて調べられ ( $3 \times 10^3$ - $9.6 \times 10^8$  viruses/ml)、その数は細菌数の0.03

Table 1. Abundance and persistence of extracellular DNA in natural environment.

Location	Molecular size (kbp)	DNA concentration (ng/ml or ng/g <sup>a</sup> )	Half-life (h)
Fresh water	ND <sup>b</sup>	0.5–88	4–5.5
Estuarine	0.12–35.2	6–44	3.4–5.5
Offshore/ocean	0.24–14.3	0.2–5.0	4.5–83
Freshwater sediment	1.0–23.0	1.0 <sup>a</sup>	ND <sup>b</sup>
Marine sediment	ND <sup>b</sup>	5,860–31,100 <sup>a</sup>	140–235

<sup>a</sup> DNA concentration in sediment<sup>b</sup> Not determined

-76倍であることがわかった<sup>69)</sup>。近年、核酸染色剤を用いて蛍光顕微鏡下で計数を行う直接計数法がウイルスにおいても可能となり<sup>5,8)</sup>、一般的にその数は細菌数の20倍と、電子顕微鏡を用いた従来の方法と比較した場合に、より多くのウイルスが環境中に存在していることが明らかとなっている (Table 2)<sup>21,69)</sup>。このウイルスと裸の DNA を含む細胞外 DNA を超遠心により分離し<sup>31)</sup>、DNase により裸の DNA を分解することで、細胞外 DNA におけるウイルス DNA の占める割合は20% (1.6–77.1%) 程度であることが分かっている<sup>69)</sup>。ウイルスの大きさは 20–750 nm (多くが 60–80 nm) であり、そのゲノムサイズは一般的に 40–80 kbp である<sup>21,69)</sup>。一方、裸の DNA の長さは 0.15–35.2 kbp であり、遺伝子をコードするのに十分な大きさを保持している<sup>12,63,64)</sup>。さらに、粘土粒子等へ結合することで数カ月間にわたって分解されることなく裸の DNA が環境中に残存し、形質転換能を保持していることが分かっている<sup>42,51)</sup>。このように環境中には、細胞外 DNA が種々の形態で豊富に存在し、その一部は遺伝子のプールとなっていると考えられる。

Table 2. Abundance of viruses in natural environment.

Location	Total number (viruses/ml)	Viruses/bacteria
Opean ocean	$3 \times 10^3$ – $1.5 \times 10^7$	1.0–50
Coastal ocean	$5 \times 10^3$ – $4.6 \times 10^8$	0.7–72
Estuarine	$2.6 \times 10^6$ – $9.6 \times 10^8$	0.4–50
Freshwater	$1.5 \times 10^5$ – $2.5 \times 10^8$	0.03–76
Average	$1.4 \times 10^8$	20

### 3. 細胞外 DNA の産生と役割

細胞外 DNA は、真核・原核生物、およびそれらに感染するウイルスに由来する (Fig. 1)。細菌由来の細胞外 DNA の産生機構として、細菌の死、原生動物等による捕食、ウイルスによる溶菌、増殖時期の一定期間に分泌<sup>42)</sup>、低分子フェロモン物質による細胞間の quorum sensing に誘導される分泌、自己溶解<sup>35,58)</sup>、および真核藻類との相互作用による分泌<sup>49)</sup>、が知られている。また産生される DNA の形態としては、DNase 感受性の裸の

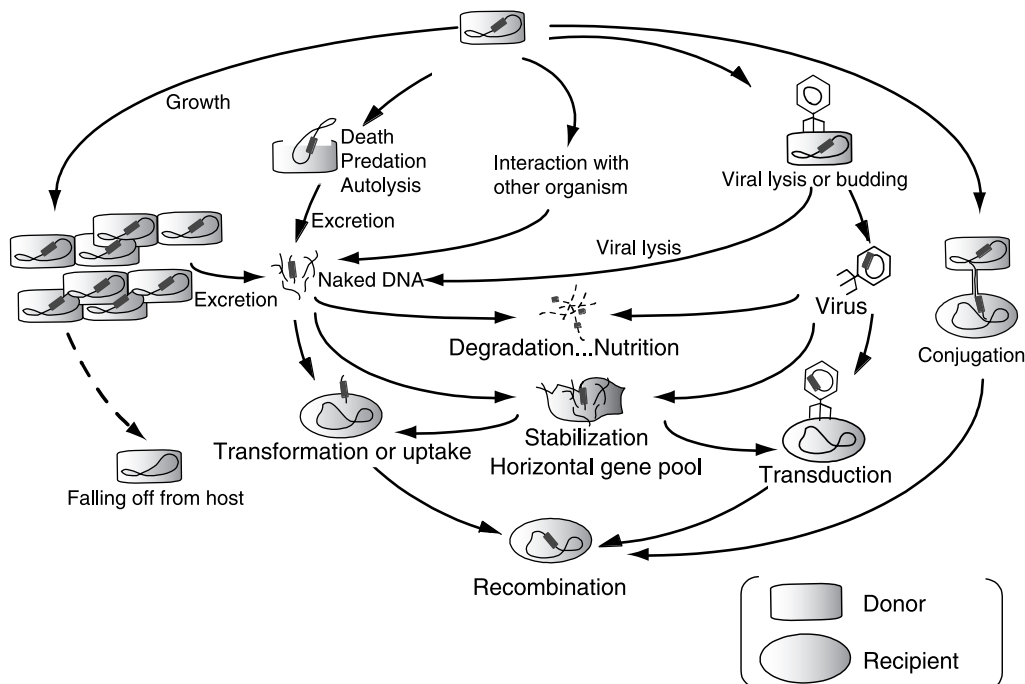


Fig. 1. Dynamics and roles of extracellular DNA in natural environment.

DNA のほか、大腸菌 O157:H7 では DNase 非感受性の DNA vesicle, *Rhodobacter capsulatus* では gene transfer agent (GTA) が報告されている<sup>57,70</sup>。一方ウイルスの産生は、宿主の溶菌を伴い、裸の DNA と共に放出される場合と、M13 ファージに見られるような宿主の溶菌を伴わない budding に分けられる<sup>21</sup>。このように細胞外 DNA は種々の様式で産生されるため、環境中に存在する細胞外 DNA を研究するためには、これらの由来となる細菌を知ることが重要な課題となっている。その手段として、裸の DNA を除去し、ウイルス殻中に存在する宿主由来の 16S rDNA の解析を行うという方法がある<sup>54</sup>。このような裸の DNA とウイルスの分離により、細胞外 DNA の由来が明らかになっていくと考えられる。

裸の DNA の役割としては、特に貧栄養条件下にある細菌にとってのリン、窒素源<sup>18,52</sup>、変異を起こした遺伝子を修復するための材料、が挙げられる<sup>18</sup>。例えば *Bacillus subtilis* においては UV 照射後に細菌の DNA 取込み能力が上がり、取り込んだ DNA との組み換えによりゲノムの変異を修復することが知られている<sup>28</sup>。そして形質転換することにより、細菌に新しい形質を与える役割も担っている。*Neisseria* や *Haemophilus* では特定の DNA 配列を認識して、近縁種の DNA を取り込むことが報告されている<sup>18,42</sup>。さらに *Pseudomonas aeruginosa* では、裸の DNA を DNase により分解することでバイオフィーム形成が阻害されることから、バイオフィーム形成に必要な因子であることが分かっている<sup>67</sup>。ウイルスも裸の DNA 同様、細菌にとっての栄養源となることが報告されている<sup>21,69</sup>。またウイルスはコートタンパク質に被われているため裸の DNA に比べると、より安定して環境中に存在すると考えられ、裸の DNA に比べ安定な遺伝子プールとしての役割や、宿主の個体数制御、すなわち環境中において特定の細菌種が増え過ぎないように微生物群集の多様性を維持する役割、を担ってい

る<sup>21,26</sup>。さらに宿主を溶菌することで、裸の DNA を含む溶存態有機物 (dissolved organic matter, DOM) の産生にも関与している<sup>69</sup>。

細胞外 DNA の由来や役割はまだ明らかになりはじめたばかりである。近年になって、海水試料中の全ウイルスの DNA 配列決定から、これまでに知られていない多くの配列が見つかった<sup>7</sup>。これは細胞外 DNA が新規遺伝子の宝庫であることを意味するだけではなく、未知の役割の存在を示唆していると考えられる。

#### 4. 細胞外 DNA の遺伝子伝播への寄与

細菌の自然形質転換能は、受容細菌に物理化学的な処理を施すことなしに指標となる遺伝子を持つ同種の細菌ゲノムを取り込むかどうかによって調べられている。その結果、60以上の細菌種において自然形質転換能を持つこと<sup>16,51,62</sup>、形質転換の頻度が細菌の増殖時期、培養に用いる培地、温度等に影響を受けることが明らかとなっている<sup>12</sup>。さらに環境因子を最適化した条件下では、*Agrobacterium*, *Legionella* や大腸菌などのこれまで自然形質転換能を持たないとされてきた細菌種でも形質転換能を持つことがわかってきた<sup>3,15,59</sup>。また海水から単離した細菌の10%が、プラスミドを取込む能力があり、14%が染色体を取込む能力を保持していた<sup>20</sup>。自然形質転換能を持つ細菌種の系統樹および、その形質転換頻度をまとめた (Fig. 2)。自然形質転換能を持つ細菌種は古細菌を含め系統的に多岐にわたっており、今後も自然形質転換能を持つ細菌種は発見されていくと考えられる。

一般的にウイルスによる形質導入は伝播頻度が低いことから、遺伝子伝播への寄与は小さいとされてきた<sup>69</sup>。しかし、ゲノム解析により配列の決定した細菌の多くが、ゲノム内にウイルス遺伝子を保持していることが明らかとなった。例えば、*Borrelia* においてはゲノムの20%、

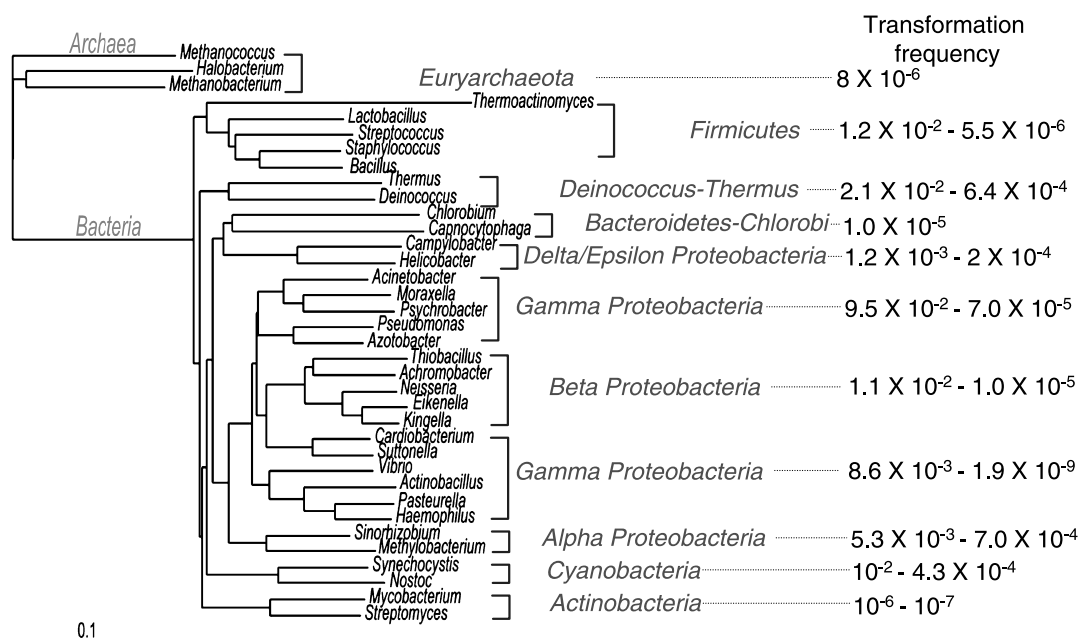


Fig. 2. Natural transformable species around the microbial world. The phylogenetic tree was described based on 16S ribosomal DNA. The value indicates transformation frequencies reported in the bacterial group.

大腸菌 O157 においてはゲノムの12%がウイルス由来であり、ゲノム中に20個ものウイルスを保持している<sup>29)</sup>。さらに臨床由来の *Salmonella typhimurium* のうち少なくとも90%以上が溶原菌であった<sup>55)</sup>。また遺伝子情報解析により、ある宿主に感染できないウイルスであっても、その宿主に感染するウイルスと共通の遺伝子を保持していることが明らかとなっている。これらのウイルスは1つの宿主に同時に感染することでウイルスゲノム同士が組み換えを起こしたことを示唆している<sup>25)</sup>。さらに大腸菌、*Shigella*, *Pseudomonas*, *Sphaerotilus*, *Rhodospirillum* など異なる属種にも感染可能な広宿主域のウイルスが見つかった<sup>30)</sup>。また高熱細菌や数種の海洋細菌より単離したウイルスが系統的にかけ離れた大腸菌や枯草菌に高い頻度で形質導入を起こすことが明らかとなっている<sup>9,10)</sup>。今後このような複数種の宿主を用いた研究により、広宿主域のウイルスが発見されていくものと考えられる。

### 5. モデル生態系における遺伝子伝播実験

これまで河川や海洋といった自然環境においても遺伝子伝播が起きていることが示されている (Table 3)。しかし自然環境においては、物理化学的および生物学的因子が複雑であることから、環境因子と遺伝子伝播の関係を明らかにすることは困難である。そこでマイクロゾムを用いて河川や海洋の浮遊層、バイオフィーム、堆積物や土壌などの遺伝子伝播の場、伝播に影響を与える温度や栄養などの環境因子、細菌の増殖期に関する検討が行われている<sup>2,48)</sup>。実際の環境により近いマイクロゾムを作製することで自然環境での伝播を推定できることから、自然環境より採取した細菌群集を用いた研究も報告されている<sup>17)</sup>。また植物の葉の表面<sup>49)</sup>、歯垢<sup>41,65)</sup>、人のだ液<sup>47)</sup>、牛乳等の食料品<sup>6)</sup>においても遺伝子伝播が起きていることを示す報告もあり、さらに新たな環境因子として雷<sup>14)</sup>、抗生物質、難分解性化学物質等の影響<sup>11)</sup>も研究

されている。このようにマイクロゾムを用いた研究により、自然環境中での実施が困難な実験系での遺伝子伝播や伝播に与える物理化学的因子、さらには細菌の捕食者である原生動物や生産者である微細藻類のような生物学的因子の影響を明らかできると考えられる<sup>2,45,46)</sup>。

### 6. 蛍光タンパク質の遺伝子伝播研究への利用

これまでの遺伝子伝播実験において、形質を獲得した細菌の検出は選択培地での増殖能にもとづいて行われてきた。培養法は、平板培地上にコロニーを形成させ分離・純培養することで、個々の形質を獲得した細菌の種類や性状を解析することが可能となる点で優れている。しかしながら、自然環境中に生息する多くの細菌は、従来の培養法では検出困難であるため、培養法を用いた場合には、遺伝子伝播頻度を過小評価している可能性がある。また指標とする遺伝子の選択が難しく、例えば試料中に抗生物質耐性を持つ細菌が既に存在している場合は、その抗生物質耐性遺伝子を指標とすることができない。そこで通常の環境にはほとんど存在しない、水銀耐性や難分解性化学物質分解遺伝子等が利用されてきた<sup>11)</sup>。しかしながら、その場合には、重金属や有害な化学物質を用いなければならないため、利便性を欠いている。そこで細菌には存在しない遺伝子である green fluorescent protein (GFP) 遺伝子が、主に接合実験に利用されてきている<sup>19,48,49)</sup>。

GFP 遺伝子の発現は、蛍光顕微鏡下で確認できるため、これまでよりも高感度に遺伝子伝播を捉えることが可能である<sup>11,19)</sup>。例えば、環境試料を用いた接合実験において、蛍光顕微鏡下で GFP を発現している細菌、すなわち接合体を計数した場合に培養法の1000倍もの高い伝播頻度が得られている<sup>23)</sup>。また培養を伴わずにシングルセルレベルで検出することで、遺伝子伝播がバイオフィーム中のどの位置で起きているのかという空間情報を得ることができるようになった<sup>19)</sup>。GFP を用いた方法

Table 3. Horizontal gene transfer studies in natural environment.

Mode	location <sup>a</sup>	Transfer frequency <sup>b</sup>	Phenotype <sup>c</sup>	Recipient	Source of DNA <sup>d</sup>	Reference No.
TF <sup>e</sup>	River plankton	$1 \times 10^{-2}$	his <sup>-</sup>	<i>A. calcoaceticus</i>	Lysate	12
TF	River biofilm	$1 \times 10^{-4}$	his <sup>-</sup>	<i>A. calcoaceticus</i>	Lysate	12
TF	River plankton	$1 \times 10^{-7}$	Hg <sup>f</sup>	<i>A. calcoaceticus</i>	Lysate	12
TF	River biofilm	$2.2 \times 10^{-6}$ – $1.0 \times 10^{-3}$	Hg <sup>f</sup>	<i>A. calcoaceticus</i>	Lysate	68
TF	River plankton	$<1 \times 10^{-4}$	his <sup>-</sup>	<i>A. calcoaceticus</i>	Viable cell	12
TF	River plankton	$1 \times 10^{-7}$	Hg <sup>f</sup>	<i>A. calcoaceticus</i>	Viable cell	12
TF	River biofilm	$9.6 \times 10^{-5}$	Hg <sup>f</sup>	<i>A. calcoaceticus</i>	Viable cell	68
TF	River biofilm	$2 \times 10^{-7}$	his <sup>-</sup>	<i>A. calcoaceticus</i>	indigenous	12
TF	River biofilm	$2.1 \times 10^{-7}$	Hg <sup>f</sup>	<i>A. calcoaceticus</i>	indigenous	68
TD <sup>f</sup>	Marine plankton	$1.6$ – $3.7 \times 10^{-8}$	kan, sm <sup>f</sup>	indigenous	phage	32
TD	River plankton	$10^{-4}$ – $10^{-5}$	Cb, sm <sup>f</sup>	indigenous	phage	53

<sup>a</sup> Study location of horizontal gene transfer

<sup>b</sup> Transfer frequency: transformant/CFU or transductant/PFU

<sup>c</sup> Phenotype for selection of transformant or transductant

his<sup>-</sup>, histidine prototroph; Hg<sup>f</sup>, mercury resistance; kan, kanamycin resistance; sm, streptomycin resistance; Cb, carbenicillin resistance

<sup>d</sup> Source of donor DNA for transformation or transduction

<sup>e</sup> Transformation

<sup>f</sup> Transduction



は、バイオフィーム中の形質転換体の検出にも用いられており<sup>20)</sup>、これまで形質転換体数を検出するには、少なくとも 1 ng/ml のプラスミドが必要であったのに対し、GFP を指標として用いた場合には 1 fg/ml で十分検出できることが示されている。しかし環境試料での遺伝子伝播実験をより高い精度で行うためには、検出に十分な量の GFP が発現していない細菌や GFP の遺伝子が発現せずに細胞内に安定して維持されている細菌を、どのように検出するのかという課題を解決しなくてはならない。

## 7. 今後の展開

ここまで述べたように、自然環境中において細胞外 DNA は細胞内 DNA よりも多量に存在している。裸の DNA は遺伝子をコードするのに十分な大きさで存在し、遺伝子としての機能を保持している。さらに形質転換が起こる細菌種は多岐に渡っており<sup>16,51,62)</sup>、環境中においても形質転換が起きることが明らかとなっている。またゲノム解析からウイルスが遺伝子伝播において重要な役割を果たしており、ウイルスの中には極めて広い宿主域を持つものが存在することが分かっている<sup>9,10)</sup>。このため、環境中での遺伝子伝播を研究するにあたっては細胞のみならず、細胞外に存在する DNA も同時に研究していくことが重要である。そのためには遺伝子の流れそのものを考慮して研究していく必要がある。

GFP の利用により遺伝子伝播研究は新しい局面を迎えた。今後、細胞内の発現していない遺伝子を標的として *in situ* PCR<sup>37,38,60,61)</sup>、*in situ* LAMP<sup>43)</sup>、SEM-ISH<sup>33)</sup>、*in situ* RCA<sup>44)</sup>、CPRINS<sup>34)</sup> 法等のシングルセルレベルでの検出法を用いることにより、遺伝子伝播の頻度をより高精度に把握し、遺伝子伝播の場や伝播に影響を与える環境因子がより明らかになると期待される。また細胞外 DNA をウイルス、裸の DNA に分離した後に、定量的 PCR を合わせて用いることで細胞内、細胞外の遺伝子の流れを定性的、かつ定量的に理解していくことができるものと考えられる。

## 8. おわりに

近年になって、*gene ecology* という遺伝子を総合的に扱う学問分野が提唱されている。*gene ecology* とは、既知の遺伝子がゲノム・生理状態・外部環境との相互関係の中で、どのように機能し、変化(変異・組換え)するのかとともに、その動態(移動・伝播)を解明し、遺伝子改変技術の評価や創薬を行う学問領域である<sup>20)</sup>。組換え生物の指標遺伝子や抗生物質耐性遺伝子に加え、その遺伝子を持つ生物の環境中での消長を明らかにすることも、*gene ecology* における主要なテーマのひとつとなっている。これまでに裸の DNA がバイオフィーム形成に必須な因子であり<sup>67)</sup>、*Neisseria* や *Haemophilus* では、特定の短い塩基配列が細胞外の DNA を取り込むためのシグナルであることが報告されている<sup>18,42)</sup>。また海水試料の全ウイルスの塩基配列のうち65%が、新規の塩基配列であることが明らかになっている<sup>7)</sup>。すなわち環境中における遺伝子・核酸の流れを明らかにし、生態学的側面

から考察するにあたっては、*gene ecology* で対象となっている遺伝子として明らかな核酸のみならず、未知の遺伝子および機能を有する物質としての両面を考慮する必要がある。

本総説においては細胞外に存在する DNA を中心に述べてきたが、自然環境中においては細胞外 RNA も細胞外 DNA と同様に多量に存在している<sup>13,63,66)</sup>。また既知の遺伝子を持つ核酸だけを捉えるのではなく、核酸そのものを研究することで生態系における新たな核酸の役割を発見する可能性もある。すなわち、*gene ecology* の概念に加え、栄養としての核酸<sup>18,21,52,69)</sup>、生理活性の指標としての RNA<sup>50)</sup>、そして機能が明らかにされていない核酸配列も考慮する学問分野が必要となる。今後、環境中での遺伝子、核酸の流れを理解するにあたっては、より包括的に核酸を対象とする生態学的发展が期待される。

## 文 献

- 1) Amann, R.I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- 2) Ashelford, K.E., J.C. Fry, M.J. Day, K.E. Hill, M.A. Learner, J.R. Marchesi, C.D. Perkins, and A.J. Weightman. 1997. Using microcosms to study gene transfer in aquatic habitats. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 81-94.
- 3) Baur, B., K. Hanselmann, W. Schlimme, and B. Jenni. 1996. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3673-3678.
- 4) Bergh, Ø., K.Y. Børsheim, G. Bratbak, and M. Heldal. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340: 467-468.
- 5) Bettarel, Y., T.S. Ngando, C. Amblard, and H. Laveran. 2000. A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2283-2289.
- 6) Bräutigam, M., C. Hertel, and W.P. Hammes. 1997. Evidence for natural transformation of *Bacillus subtilis* in foodstuffs. *FEMS Microbiol. Lett.* 155: 93-98.
- 7) Breitbart, M., P. Salamon, B. Andresen, J.M. Mahaffy, A.M. Segall, D. Mead, F. Azam, and F. Rohwer. 2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 14250-14255.
- 8) Chen, F., J.-R. Lu, B.J. Binder, Y.-C. Liu, and R.E. Hodson. 2001. Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR gold. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 539-545.
- 9) Chiura, X.H. 1997. Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 13: 75-83.
- 10) Chiura, X.H. 2002. Broad host range xenotrophic gene transfer by virus-like particles from a hot spring. *Microbes Environ.* 17: 53-58.
- 11) Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid.* 42: 73-91.
- 12) Day, M. 2002. Transformation in aquatic environment, pp. 63-80. In M. Syvanen and C.I. Kado (ed.), *Horizontal Gene Transfer*, Academic Press, London.
- 13) Dell'anno, A., M. Faviano, M.L. Mei, and R. Danovaro. 1999. Pelagic-benthic coupling of nucleic acids in an abyssal location of the northeastern Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4451-4457.
- 14) Demanéche, S., F. Bertolla, F. Buret, R. Nalin, A. Sailland, P. Auriol, T. M. Vogel, and P. Simonet. 2001. Laboratory-scale evidence for lightning-mediated gene transfer in soil.

- Appl. Environ. Microbiol. 67: 3440-3444.
- 15) Demanéche, S., E. Kay, F. Goumbié, and P. Simonet. 2001. Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil. Appl Environ. Microbiol. 67: 2617-2621.
  - 16) de Vries, J., P. Meier, and W. Wackernagel. 2001. The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. FEMS Microbiol. Lett. 195: 211-215.
  - 17) DiGiovanni, G.D., J.W. Neilson, I.L. Pepper, and N.A. Sinclair. 1996. Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2521-2526.
  - 18) Dubnau, D. 1999. DNA uptake in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 53: 217-244.
  - 19) Errampalli, D., K. Leung, M.B. Cassidy, M. Kostrzynska, M. Blears, H. Lee, and J.T. Trevors. 1999. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. J. Microbiol. Methods. 35: 187-199.
  - 20) Frischer, M.E., G.J. Stewart, and J.H. Paul. 1994. Plasmid transfer to indigenous marine bacterial populations by natural transformation. FEMS Microbiol. Ecol. 15: 127-136.
  - 21) Fuhrman, J.A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. Nature 399: 541-548.
  - 22) Griffith, F. 1928. The significance of pneumococcal types. J. Hyg. 27: 113-159.
  - 23) Hausner, M., and S. Wuertz. 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3710-3713.
  - 24) Hendrickx, L., M. Hausner, and S. Wuertz. 2003. Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1721-1727.
  - 25) Hendrix, R.W., M.C.M. Smith, R.N. Burns, M.E. Ford, and G.F. Hatfull. 2002. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage, pp. 133-140. In M. Syvanen and C.I. Kado (ed.), Horizontal Gene Transfer, Academic Press, London.
  - 26) Hennes, K.P., C.A. Suttle, and A.M. Chan. 1995. Fluorescently labeled virus probes show that natural virus populations can control the structure of marine microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3623-3627.
  - 27) Ho, M.-H., T. Traavik, O. Olsvik, B. Tappeser, C.V. Howard, C. von Weizsacker, and G.C. MaGavin. 1998. Gene technology and gene ecology of infectious diseases. Microb. Ecol. Health Dis. 10: 33-59.
  - 28) Hoelzer, M.A., and R.E. Michod. 1991. DNA repair and the evolution of transformation in *Bacillus subtilis*. III. Sex with damaged DNA. Genetics. 128: 215-223.
  - 29) Jain, R., M.C. Rivera, J.E. Moore, and J.A. Lake. 2002. Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. Theor. Popul. Biol. 61: 489-495.
  - 30) Jensen, E.C., H.S. Schrader, B. Rieland, T.L. Thompson, K.W. Lee, K.W. Nickerson, and T.A. Kokjohn. 1998. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 575-580.
  - 31) Jiang, S.C., and J.H. Paul. 1995. Viral contribution to dissolved DNA in the marine environment as determined by differential centrifugation and kingdom probing. Appl. Environ. Microbiol. 61: 317-325.
  - 32) Jiang, S.C., and J.H. Paul. 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2780-2787.
  - 33) 見坂武彦, 石徹白愛, 山口進康, 谷佳津治, 那須正夫. 2003. 走査型電子顕微鏡を用いた菌体内遺伝子の検出. 第19回日本微生物生態学会講演要旨集. p. 89.
  - 34) 見坂武彦, 山口進康, 谷佳津治, 那須正夫. 2004. 抗生物質耐性遺伝子をもつ細菌のシングルセルレベルでの検出. 日本薬学会第124年会. 29[P1]III-199.
  - 35) Kloos, D.K., M. Strätz, A. Güttler, R.J. Steffan, and K.N. Timmis. 1994. Inducible cell lysis system for the study of natural transformation and environmental fate of DNA released by cell death. J. Bacteriol. 176: 7352-7361.
  - 36) Koonin, E.V., K.S. Makarova, and L. Aravind. 2001. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. Annu. Rev. Microbiol. 55: 709-742.
  - 37) Kurokawa, K., K. Tani, and M. Nasu. 1997. Direct in situ PCR method for the detection of verotoxin-producing *Escherichia coli*. Jpn. J. Bacteriol. 52: 513-518.
  - 38) Kurokawa, K., K. Tani, M. Ogawa, and M. Nasu. 1999. Abundance and distribution of bacteria carrying *stII* gene in natural river water. Lett. Appl. Microbiol. 61: 405-410.
  - 39) Lederberg, J. 1987. Genetic recombination in bacteria: a discovery account. Annu. Rev. Genet. 21: 23-46.
  - 40) Lederberg, J., and E.L. Tatum. 1946. Gene recombination in *Escherichia coli*. Nature 158: 558.
  - 41) Li, Y., P.C.Y. Lau, J.H. Lee, R.P. Ellen, and D.G. Cvikovitch. 2001. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. J. Bacteriol. 183: 897-908.
  - 42) Lorenz, M.G., and W. Wackernagel. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol. Rev. 58: 563-602.
  - 43) Maruyama, F., T. Kenzaka, N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu. 2003. Detection of bacteria carrying the *stx<sub>2</sub>* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5023-5028.
  - 44) 丸山史人, 見坂武彦, 山口進康, 谷佳津治, 那須正夫. 2003. In situ RCA 法による特定遺伝子を持つ細菌の検出. 第19回日本微生物生態学会講演要旨集. p. 90.
  - 45) Matsui, K., N. Ishii, and Z. Kawabata. 2003. Release of extracellular transformable plasmid DNA from *Escherichia coli* cocultivated with algae. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2399-2404.
  - 46) Matsui, K., N. Ishii, and Z. Kawabata. 2003. Microbial interactions affecting the natural transformation of *Bacillus subtilis* in a model aquatic ecosystem. FEMS Microbiol. Ecol. 45: 211-218.
  - 47) Mercer, D.K., K.P. Scott, C.M. Melville, L.A. Glover, and H.J. Flint. 2001. Transformation of an oral bacterium via chromosomal integration of free DNA in the presence of human saliva. FEMS Microbiol. Lett. 200: 163-167.
  - 48) Molin, S., and T.-T. Nielsen. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. Curr. Opin. Biotechnol. 14: 255-261.
  - 49) Normander, B., B.B. Christensen, S. Molin, and N. Kroer. 1998. Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*). Appl. Environ. Microbiol. 64: 1902-1909.
  - 50) Ostle, N., A.S. Whiteley, M.J. Bailey, D. Sleep, P. Ineson, and M. Manefield. 2003. Active microbial RNA turnover in a grassland soil estimated using a <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> spike. Soil Biol. Biochem. 35: 877-885.
  - 51) Paget, E., and P. Simonet. 1994. On the track of natural transformation in soil. FEMS Microbiol. Ecol. 15: 109-117.
  - 52) Redfield, R.J., M.R. Schrag, and A.M. Dean. 1997. The evolution of bacterial transformation: sex with poor relations. Genetics 146: 27-38.
  - 53) Ripp, S., O.A. Ogunseitan, and R.V. Miller. 1994. Transduction of a freshwater microbial community by a new *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage, UT1. Mol. Ecol. 3: 121-126.
  - 54) Sander, M., and H. Schmieger. 2001. Method for host-independent detection of generalized transducing bacteriophages in natural habitats. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1490

- 1493.
- 55) Schicklmaier, P., and H. Schmieger. 1995. Frequency of generalized transducing phages in natural isolates of the *Salmonella typhimurium* complex. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1637-1640.
- 56) Sikorski, R.S., W. Michaud, H.L. Levin, J.D. Boeke, and P. Hieter. 1990. Trans-kingdom promiscuity. *Nature* 345: 581-582.
- 57) Solioz, M., H.-C. Yen, and B. Marrs. 1975. Release and uptake of gene transfer agent by *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* 123: 651-657.
- 58) Steinmoen, H., E. Knutsen, and L.S. Håvarstein. 2002. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 7681-7686.
- 59) Stone, B.J., and Y.A. Kwaik. 1999. Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili. *J. Bacteriol.* 181: 1395-1402.
- 60) Tani, K., K. Kurokawa, and M. Nasu. 1998. Development of a direct in situ PCR method for detection of specific bacteria in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1536-1540.
- 61) Tani, K., M. Muneta, K. Nakamura, K. Shibuya, and M. Nasu. 2002. Monitoring of *Ralstonia eutropha* KT1 in groundwater in an experimental bioaugmentation field by in situ PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 412-416.
- 62) Tønjum, T., K. Bøvre, and E. Juni. 1995. Fastidious gram-negative bacteria: meeting the diagnostic challenge with nucleic acid analysis. *APMIS.* 103: 609-627.
- 63) Trevors, J.T. 1996. Nucleic acids in the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 331-336.
- 64) Turner, A.K., and R. Sellwood. 1997. Extracellular DNA from *Serpulina hyodysenteriae* consists of 6.5 kbp random fragments of chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 150: 75-80.
- 65) Wang, B.Y., B. Chi, and H.K. Kuramitsu. 2002. Genetic exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms. *Oral Microbiol. Immunol.* 17: 108-112.
- 66) Weinbauer, M.G., and P. Peduzzi. 1996. Comments on the determination of nucleic acids in natural waters by the CTAB-DABA-orceinol method. *Sci. Total Environ.* 177: 97-103.
- 67) Whitchurch, C.B., T.-T. Nielsen, P.C. Ragas, and J.S. Mattick. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 295: 1487.
- 68) Williams, H.G., M.J. Day, J.C. Fry, and G.J. Stewart. 1996. Natural transformation in river epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2994-2998.
- 69) Wommack, K.E., and R.R. Colwell. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 69-114.
- 70) Yaron, S., G.L. Kolling, L. Simon, and K.R. Matthews. 2000. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4414-4420.
- 71) Zinder, N.D., and J. Lederberg. 1952. Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 64: 679-699.