

環境中におけるプラスミドの挙動解析

Comparisons of Conjugation Frequency in Different Environmental Conditions

新谷 政己^{1*}, 松井 一泰², 金原 和秀¹, 野尻 秀昭²

MASAKI SHINTANI^{1*}, KAZUHIRO MATSUI², KAZUhide KIMBARA¹ and HIDEAKI NOJIRI²

¹ 静岡大学大学院工学研究科化学バイオ工学専攻 〒432-8561 静岡県浜松市中区城北 3-5-1

² 東京大学生物生産工学研究センター 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

* TEL & FAX: 053-478-1181

* E-mail: tmshint@ipc.shizuoka.ac.jp

¹ Department of Applied Chemistry and Biochemical Engineering, Graduate School of Engineering, Shizuoka University, 3-5-1 Johoku, Naka-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561, Japan

² Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

キーワード: プラスミド, 接合伝達, 宿主域

Key words: plasmid, conjugative transfer, host range

(原稿受付 2013年11月15日/原稿受理 2013年11月22日)

1. はじめに

細胞が分裂にともなって情報を母細胞から娘細胞に遺伝するのに対し、個々の細胞間、個体間で遺伝情報を授受することは、遺伝子の水平伝播機構として知られる。特に、世代時間が短いと考えられる細菌においては、この機構によって、新たな遺伝情報を獲得することで、急速に進化し、様々な環境に適応すると考えられている。こうした水平伝播現象の多くは、可動性遺伝因子とよばれる、遺伝子の「運び手」によって担われている。プラスミドは微生物がもつ染色体外の自律的な複製単位で、天然由来のプラスミドは、環状型または線状型の構造をとり、10 kb 未満の小型のものから 1 Mb に及ぶ巨大なものまで様々で、さらにそれらを有する微生物種 (= 宿主) にも非常に多様性がある。可動性遺伝因子のうち、接合伝達性のプラスミドは、細菌間の接触 (= 接合) によって、プラスミドをもつ細菌 (供与菌) から持たない細菌 (受容菌) へと複製を伴いながら伝達され、プラスミドを受け取った受容菌 (= 接合完了体) 内部で染色体とは独立して複製される^{14,69}。プラスミドのこのような性質から、発見されてから現在に至るまで、分子生物学の有用なツールとして利用され、また大腸菌をはじめとする、限られた種類の細菌内における性質や対象細菌間の接合伝達メカニズムについては、詳細に研究がなされてきた (後述, 3 の項を参照)。一方、プラスミドの接合伝達現象は、人為起源の環境汚染物質を分解可能な微生物の出現や、病院内で深刻な感染症を引き起こす、数種類の抗生物質に耐性を示す病原菌の出現にも深く関与することから、環境バイオテクノロジー・医療分野においても重要な研究対象である^{34,43,51,57,61}。このような背景にもとづき、1980年代後半から、実験室内、および

自然環境を模した試料内における、種々のプラスミドの接合実験が行われてきた。本総説では、可動性遺伝因子のうち、接合伝達性のプラスミドに焦点を絞り、プラスミドの種類やそれらの接合伝達性について概説した後、環境中における挙動解析の報告例について紹介する。

2. プラスミドの分類

同一の細菌細胞内に 2 種類のプラスミドが存在するとき、細胞分裂後、双方ともに安定して維持されず、どちらか片方のみしか維持されない場合、このような性質をプラスミドの不和合性とよび、これら 2 種類のプラスミドは同一の不和合性群に属するという。不和合性は、2 つのプラスミドが宿主内で複製・維持されるための機構が類似する場合に生じるため、今なおプラスミド分類の指標に使われている (なお、プラスミドの複製・維持機構については、これまで複数のプラスミドについて詳細が調べられており、ここでの詳細な説明は最近の総説^{45,47}に譲り割愛する)。グラム陰性細菌については、大腸菌を宿主とした際の 26 種 (IncA~IncZ) のプラスミドグループ^{27,66}と、土壌や海洋等に生息する *Pseudomonas* 属細菌を中心とした 14 種の不和合性群 (IncP-1~IncP-14)⁷¹が知られている (表 1, 2)。前者のグループ内では不和合性群の重複があり、例えば IncA と IncC, IncB と IncO は同一の不和合性群である。また 2 つのグループ間でも一部重複する (IncP=IncP-1, IncA=IncC=IncP-3, IncQ=IncP-4, IncG=IncU=IncP-6) が、その他については全く性質を異にするグループがほとんどである。一方、グラム陽性細菌を中心に約 18 種 (Inc1~Inc15, Inc18 等)⁶⁹のプラスミドグループが存在する (表 3) が、これらは大腸菌では複製されないた

表 1. 腸内細菌におけるプラスミドの不和合性群とその接合伝達機構における分類

不和合性群 ^a	プラスミド (例) ^b	MOB ^c	MPF ^c
IncA/C	RA1	MOB _H	MPF _F
IncB/O	R724	MOB _p	MPF _I
IncD	R711b	—	—
IncF	F	MOB _F	MPF _F
IncG/U (=IncP-6)	Rms149	MOB _p	—
IncH	R27	MOB _H	MPF _F
IncI	R46	MOB _p	MPF _I
IncK	R387	MOB _p	MPF _I
IncL/M	R446b, pIP135	MOB _p	MPF _I
IncN	N3	MOB _F	MPF _T
IncP (=IncP-1)	RK2	MOB _p	MPF _T
IncQ (=IncP-4)	RSF1010	MOB _Q	—
IncS (=IncHI2)	R478	MOB _H	MPF _F
IncT	Rts1, R401	MOB _H	MPF _F
IncW	R388	MOB _F	MPF _T
IncX	R6K	MOB _p	MPF _T

^a IncA と IncC 等, いくつかの Inc 群については重複している。また, 表 2 における *Pseudomonas* 属細菌における Inc 群とも重複する場合もある。^b 例として挙げたプラスミドについては, Lawley ら, および Sota & Top の総説^{27,66)} に基づく。^c MOB, MPF の分類については Smillie らの総説⁶²⁾ に基づく。「—」は情報が無い, あるいは元来もっていないことを示す。

表 2. *Pseudomonas* 属細菌におけるプラスミドの不和合性群とその接合伝達機構における分類

不和合性群 ^a	プラスミド (例) ^b	MOB ^c	MPF ^c
IncP-1 (=IncP)	RK2, pB10	MOB _p	MPF _T
IncP-2	CAM	—	—
IncP-3 (=IncA/IncC)	RIP64	MOB _H	MPF _F
IncP-4 (=IncQ)	RSF1010	MOB _Q	—
IncP-5	Rms163	—	—
IncP-6 (=IncG/IncU)	Rms149	MOB _p	—
IncP-7	pCAR1, pDK1	MOB _H	MPF _F
IncP-8	FP2	—	—
IncP-9	pWW0, NAH7	MOB _F	MPF _T
IncP-10	R91	—	—
IncP-11	pMG39	—	—
IncP-12	R716	—	—
IncP-13	pMG25	—	—
IncP-14	pBS222	—	—

^a いくつかの Inc 群については表 1 に示した腸内細菌における Inc 群とも重複する。^b 例として挙げたプラスミドについては, Thomas & Haines の総説⁷¹⁾ に基づく。^c MOB, MPF の分類については Smillie らの総説⁶²⁾ に基づく。「—」は情報が無い, あるいは元来もっていないことを示す。

め, 先の 2 つの不和合性群の大分類との重複はないと考えられている。

近年の DNA シークエンス技術の進歩に伴い, 次々と新しいタイプのプラスミドが見出され, 2013 年 3 月時点で 3964 のプラスミドの全塩基配列が米国国立生物学情報センター (NCBI) のデータベースに登録されているが, 多くのプラスミドについては明確な分類がされていない。また, シークエンス解析されたプラスミドと

表 3. グラム陽性細菌におけるプラスミドの不和合性群とその接合伝達機構・複製機構における分類

不和合性群	プラスミド (例) ^a	MOB ^b	MPF ^b	Rep タイプ ^c
Inc1	pSK1	—	—	Unique
Inc2	pII145	—	—	—
Inc3	pT127	—	—	—
Inc4	pC221	—	—	7
Inc5	pS177	—	—	—
Inc6	pK545	—	—	—
Inc7	pUB101	—	—	19
Inc8	pC194	—	—	13
Inc9	pUB112	—	—	7
Inc10	pC223	MOB _p	—	7b
Inc11	pE194	MOB _v	—	Unique
Inc12	pE1764	—	—	—
Inc13	pUB110	MOB _v	—	22
Inc14	pCW7	—	—	7
Inc15	pWBG637	—	—	—
Inc18	pIP501	—	—	1

^a 例として挙げたプラスミドは Taylor らの総説⁶⁸⁾ に基づく。^b MOB, MPF の分類については Smillie らの総説⁶²⁾ に基づく。「—」は情報が無い, あるいは元来もっていないことを示す。^c Rep タイプの分類 (数字) については Jensen ら, および Lozano らの論文^{22,30)} に基づく。「—」は情報が無いことを示す。

は別に, 海洋性細菌からのプラスミドの大半は, 既存の分類に当てはまらないことという報告もなされている^{31,63)}。従って, 上述した不和合性群による分類には属さないプラスミドも非常に多い。近年, グラム陽性細菌由来のプラスミドについては, 複製を開始する Rep タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に基づいて, 新たな分類群を提唱し, より多くのプラスミドの分類を可能にしたという報告がなされた (表 3)^{22,30)}。しかし, 同一のプラスミド上に複数の Rep 遺伝子をもつプラスミドも存在する上, 同一の不和合性群に属するプラスミドは, 必ずしも同じ接合伝達機構を持つわけではないため, 不和合性による分類は, プラスミドの接合伝達性を分類するのに必ずしも適さない。そこで Smillie らは, 接合伝達性プラスミドについては, 不和合性による分類とは別に, その接合伝達時に必要な, DNA の複製・移動を担うタンパク質 (MOB: mobilization) と, 細胞間の接触を促進するタンパク質 (MPF: mating pair formation) (いずれも後述), それぞれのアミノ酸配列の相同性に基づく分類を行った⁶²⁾。これら 2 種類のタンパク質群, MOB (MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_p, MOB_v), MPF (MPF_F, MPF_I, MPF_G, MPF_T) による分類を組み合わせることで, さらに広範囲のプラスミドを分類可能と報告している (表 1-3)⁶²⁾。

プラスミドは接合伝達によって微生物間を移動するが, プラスミド自体に接合伝達に必要な機能遺伝子が備わっている自己伝達性 (self-transmissible) プラスミドと, 自己伝達性プラスミドの接合伝達に伴って移動可能な可動性 (mobilizable) プラスミドとに分けられる。また, プラスミドが接合伝達によって移動可能な微生物の種類, また微生物細胞の分裂に伴ってプラスミドが複製可能な微生物の種類幅を宿主域とよぶ (厳密には, プ

プラスミドがある宿主に伝達しても、その細胞内で複製できない例もあり、複製能と接合伝達能のそれぞれが規定する宿主域の幅には違いが生じる。ただし、従来の研究の多くは、プラスミドがある細胞に接合伝達後、複製されることで、その細胞をプラスミドの宿主とみなしてきた。プラスミドは、その宿主の分類上、異なる門 (phylum) や綱 (class) に属する細菌間を伝達し複製されるものと、同一の属 (genus) や種 (species) および類縁の株 (strain) 間のみ伝達し複製されるものに大別されてきた。前者は“広宿主域 (broad host range)” プラスミド、後者は“狭宿主域 (narrow host range)” プラスミドとよばれる。

今後も発見されるプラスミドの数は増大するものと考えられるが、新規プラスミドの中には、上で述べたような複製・維持・接合伝達性 (頻度・宿主域) について情報が全く無いものも少なくない。

3. プラスミドの接合伝達機構

グラム陰性細菌のプラスミドの伝達は、relaxase と呼ばれるタンパク質によって、接合伝達の開始点 (*oriT*) に切れ目 (ニック) が入れられた後、プラスミドの二本鎖 DNA のうち、片方の鎖の複製が開始する。伸長した一本鎖 DNA は IV 型のカップリングタンパク質 (T4CP) の仲介によって、MPF タンパク質が形成する IV 型分泌装置 (T4SS) 内部を通して供与菌から受容菌へと移動することで生じる⁶²⁾。多くのプラスミドの塩基配列が明らかになるにつれ、自己伝達性プラスミドは MOB (*oriT*, relaxase, T4CP), MPF (T4SS) の全てを備えていること、可動性プラスミドは、このうち T4SS を欠くことが明らかになってきた⁶²⁾。このようにグラム陰性細菌のプラスミドの伝達は、多くのタンパク質によって担われるため、自己伝達性プラスミドのサイズは必然的に 30 kb 以上になる。

一方、グラム陽性細菌のプラスミドの接合伝達については、*Enterococcus* 属細菌のプラスミド (pIP501, pCF10 等) や *Streptomyces* 属細菌のプラスミド (pSVH1 等) を中心に研究が進められている。その機構は大きく 2 つに分けられる。すなわち、グラム陰性細菌と比べるとより単純な複合体ではあるが、同様に IV 型分泌装置内部を一本鎖 DNA が移動することで伝達するタイプと、細胞分裂時や孢子形成時の染色体 DNA のように、二本鎖 DNA が膜隔壁を通じて転位 (translocation) することで伝達するタイプである¹³⁾。後者は、細胞が菌糸を形成して細長く増殖する *Streptomyces* 属細菌に認められ、このタイプの伝達には、二本鎖 DNA の転位に関与する FtsK 様のタンパク質のみ (TraB と命名されている) が必要とされている^{54,76)} が、その機構の詳細については不明な点が多い^{16,70)}。

プラスミドが接合伝達によって供与菌から受容菌へと移動する頻度は、多くの場合、以下の手法で求められる。プラスミドを有する細菌 (供与菌) と、プラスミドを受け取る可能性のある細菌 (受容菌) とを別々に培養し、液体培地、あるいは固体培地、または水や栄養源は通すが菌体は通さないフィルター上で混合し、接合させる。接合後の混合液を、接合完了体のみ生育できる平板

培地で選抜し、得られたコロニー数を計測して、同時に計測した供与菌や受容菌のコロニー数とから、供与菌 1 CFU (colony forming unit) あたり、または受容菌 1 CFU あたりの数を算出し、その値を接合伝達頻度とする。計算上もっとも高い頻度は 1 (10^0) であり、 $10^0 \sim 10^{-8}$ 程度まで、その頻度はプラスミドごとに、または接合する条件ごとに異なる。Maher & Taylor は IncH, IncM, IncP, IncT, IncW に属するプラスミドを、同一の供与菌から複数の受容菌に対してそれぞれ一対一で接合させて、その伝達頻度を調べたところ、プラスミドの種類によって頻度が異なることを報告した³²⁾。このような接合伝達頻度の違いは、各プラスミドの接合伝達を担うタンパク質の性質や、その発現制御機構、供与菌・受容菌として用いる細菌の種類などによって生じる。

F (IncF), R27 (IncH) 等のプラスミドについては、接合伝達に必要なタンパク質の発現は、通常抑制されている。抑制因子に変異が生じ、その抑制が解除されると、接合伝達頻度が劇的に上昇するため、このようなプラスミドは古くから derepressed (*drd*) プラスミドとして知られている。一方、高頻度で接合伝達することが知られる RP4 (IncP=IncP-1) においては、接合伝達に必要な遺伝子群の転写が「常時」行われていると考えられている。これら接合伝達を担うタンパク質をコードする遺伝子群の詳細な転写制御機構については、Frost & Karalman の総説にまとめられているので、そちらを参照されたい¹⁴⁾。

グラム陰性細菌のプラスミドの接合時に必須な性繊毛 (sex pili) の性質によって、固体上あるいは液体内における接合伝達のしやすさが変化することが知られている。例えば IncF に属する F プラスミドの性繊毛は「やわらかい=flexible」と表現され、液体内における接合伝達に適し、高い伝達頻度を示す一方、「固い=ligid」と表現される IncP 群の RP4 は固体上での接合伝達頻度が高い。また、IncHI 群に属する R27 の接合伝達機構は温度感受性を示し、 14°C 以上 37°C 以下の温度条件のみで接合伝達する³²⁾。IncP-7 群に属する pCAR1 および pDK1 は、受容菌が同一であっても、異なる種類の供与菌から各プラスミドを接合伝達させるとその接合伝達頻度が増加する^{56,79)}。また、de la Cruz-Perera らは、受容菌として 15 種類の異なる細菌を用いて、IncP-1 プラスミドの接合伝達性について調べたところ、供与菌・受容菌を一種類ずつ用いた場合と、受容菌を全て混合した場合の接合実験の結果、接合伝達の成否が異なると報告している¹³⁾。このように、プラスミドの伝達頻度は、その宿主や環境因子によって大きく変化することが実験室内の研究においても知られている。

4. プラスミドの接合伝達現象の可視化

3 で述べたようなプラスミドの接合伝達がどの程度の頻度で生じるのかを測定するには、供与菌が感受性となる抗生物質耐性を受容菌に付加し、プラスミド上には、別の抗生物質耐性遺伝子を付加することが多い。こうすることで、供与菌、受容菌、接合完了体の区別が簡便となる。一方、自然界におけるプラスミドの伝播効率を調べる場合、元来抗生物質耐性をもつ微生物が数多く存在

するため、こうした抗生物質マーカーによる選抜方法はあまり適当でない。そこで、自然界に存在しにくいマーカー遺伝子として、*lacZY*, *gusA*, *luxAB*, *lac*, *gfp*, *xyIE* などを、抗生物質耐性能と組み合わせて検出を行う方法が用いられる⁶⁴⁾。*LacZY*はラクトースの資化能を、他の遺伝子は生物発光を指標にすることができる。特に、*lac* プロモーターと抑制因子 *LacI* を組合せて蛍光タンパク質の発現を制御することで、接合完了体のみ蛍光を示す手法は広く利用されている⁶⁴⁾。本システムでは、プロモーター下流から発現する蛍光タンパク質の遺伝子 (*gfp* 等) をプラスミド上に搭載させ、供与菌の染色体上には抑制因子である *lacI* 遺伝子を挿入しておく。すると、プラスミドが供与菌内に留まる間は蛍光タンパク質が発現しないが、プラスミドが接合伝達によって他の微生物に移動すると、脱抑制して発現し、蛍光を示すようになる⁶⁴⁾。供与菌を混合した微生物集団内にどのような微生物が存在するのかが分かっている場合には、混合液を、パラホルムアルデヒド溶液を用いて固定化し、標的とする微生物の 16S rRNA に対して、標識したプローブとハイブリダイゼーションさせる *fluorescens in situ hybridization* (FISH) 法と組み合わせる場合もある。

FISH 法は、細菌細胞内に高コピーで存在する 16S rRNA を標的として検出するには適しているが、一般には低コピーのターゲットを検出するのは難しい。Niki & Hiraga は、プラスミドを断片化し、蛍光色素を各断片に取り込ませてプローブとして用いることで、低コピープラスミドを一分子レベルで検出することに成功している⁴¹⁾。また、近年は、ターゲット配列周囲の DNA 領域自体を等温条件下のローリングサークル複製機構を利用した増幅を行った後にプローブで検出したり、プローブ結合後にシグナルを増幅したり、ターゲットとなる DNA 領域に対して高密度にプローブを設計したりする等、FISH 法のシグナルを増強することで、低コピーの遺伝子の検出が可能になりつつある⁸⁰⁾。

5. プラスミドの環境中における挙動解析

土壌・海洋・河川・湖沼など実際の環境では、3 で述べたような実験室内での接合実験に比べ、微生物集団の密度が低く、利用可能な栄養源も少ない上、温度も低いことが多い。また、自然環境中の微生物の大半は、難培養性、または未培養と考えられている。こうした微生物には、まだ培養法が確立していない細菌や、著しく生育速度の低い細菌、または種々の条件によって (培養できていた) 細菌が培養できない状態に変化した細菌、など様々な細菌が含まれる。従って、培養可能な細菌を対象とし、実験室内の接合実験の結果に基づいて決められた、プラスミドの接合伝達頻度や宿主域は、自然環境におけるプラスミドの接合現象の実態を必ずしも正確に反映していないと考えられる。そこで、難培養性・未培養細菌を含む、非滅菌の環境試料を用いたモデル環境やモデル生態系を作製し、そうした試料内におけるプラスミドの伝達頻度の測定や、宿主域の調査が実施されてきた。

5.1 土壌中におけるプラスミドの接合伝達

土壌には非常に多様な細菌が生息するが、その数や種類は、土壌自体の性質や、その土壌に生育する植物種によっても変わり、気候の変動に伴う気体成分、液体成分、固体成分の割合・性質の変化にも影響される。環境変動に伴って遺伝子を授受しうる微生物の数・種類が変化することで、プラスミドの接合伝達頻度も変化することが予想される。このように、様々な因子によって変動する自然環境を完全に再現するようなモデル環境・生態系を構築するのは不可能であるため、いくつかの環境因子を限定した人為的なモデル環境を作製せざるを得ない。従って、各々の研究によって、設定する環境因子が異なるため、それらを同列で比較することは難しいが、ここではいくつかの報告例について表 4 に示した。

土壌におけるプラスミドの接合伝達の成否に、影響を及ぼす非生物的な因子としては、土の湿度や温度⁴⁹⁾、pH⁵⁰⁾、土を構成する成分の違い⁴⁸⁾ などが挙げられる。また、生物因子としては、ミミズや原生動物、菌類が存在する場合に、プラスミドの接合伝達頻度に変化が生じることが報告されている (表 4)。また土壌に含まれる栄養源もプラスミドの伝播に影響を及ぼすことが知られ、一般に栄養が豊富な場所で接合伝達が多くなる傾向が多く、特に植物の根の周囲 (根圏) で高い頻度で検出された⁷⁵⁾。また、実験室内で行われるフィルター上での接合実験より、アルファルファの芽とともに行った接合実験の方が、伝達頻度が高いという報告もある (表 4)。さらに、施肥を行った土壌もプラスミドの伝播が生じやすい場所として知られており、特に堆肥中に抗生物質等が含まれている場合、遺伝子組換え微生物の耐性遺伝子と共にプラスミドが土壌中の土着の細菌に伝播したという報告もある⁴⁾。

5.2 水環境中におけるプラスミドの接合伝達

地球の表面積のうち 70% 以上は海に覆われており、様々な微生物が生息している。また湖沼や川、池といった様々な淡水環境も地球各地に点在しており、同じように多種多様な微生物が生息している。モデル水環境におけるプラスミドの接合伝達頻度を測定した研究例について表 5 に示した。自然の水環境を完全に模倣することは不可能であり、また各研究の結果を比較することは難しい点は土壌の場合と同様である。

水環境の多くは、土壌に比べて細菌密度が低く、また栄養源も乏しいが、局所的にバイオフィームと呼ばれる微生物集団の構造体を形成する。近年、自然界に存在する微生物の大半は物質の表面にバイオフィームの形態をとるとも考えられている^{12,44)}。バイオフィームは微生物集団が高密度に凝集して微生物同士の接触が生じやすい上、外界からの攻撃を受けにくいいため、プラスミドの伝播が生じやすいと考えられている。実際に、河川の底の岩上の細菌群集 (バイオフィーム) において、高い頻度でプラスミドの接合伝達が発見された (表 5)。また共焦点レーザー顕微鏡を用いて、バイオフィーム内における接合伝達体を細胞レベルで検出し、バイオフィームのどこでどの程度接合伝達が生じているのかを明らかにした報告もある^{7,78)}。

表 4. 土壌・根圏等におけるプラスミドの接合実験とその伝達頻度

実験環境	実験条件など	接合期間	接合実験に用いた供与菌・受容菌の組合せ ^a	結果	文献
土壌	滅菌; 28°C	12 d	D: <i>E. coli</i> HB101 (pBLK1-2) R: <i>Rhizobium fredii</i> USDA 201	1.8×10^{-4} 受容菌あたり	48
土壌	栄養源を添加した非滅菌土壌, 28°C	3-6 d	D: <i>E. coli</i> R: <i>E. coli</i> CV601	pTH16: 6.2×10^{-4} pIE1037: 2.3×10^{-4} pIE1056: 8.4×10^{-4} pIE639: 3.1×10^{-6} pIE1055: 検出されず pIE1040: 検出されず いずれも受容菌あたり	46
土壌	土壌抽出物から作製した培地にフィルターをのせて接合実験, 25°C	48 h	D: <i>P. putida</i> KT2442 <i>lacF::dsRed</i> (RP4:: <i>gfp</i>) R: 土着の細菌	1.49×10^{-4} 受容菌あたり	39
土壌	非滅菌, 砂質土壌 (水分含量 60%), 4, 10, 15, 25°C	22 d	D: <i>E. coli</i> K12 J5-3 (RP4) R: 土着の細菌	4.6×10^{-3} 供与菌あたり	64
腐植土	非滅菌土壌に加えて菌糸が付着したオオムギの葉, またはしていない葉, 25°C	17 d	D: KT2442 <i>LacIq</i> /TOL <i>gfp</i> , Km R: KT2440 Tc ⁺	菌糸なし: 1.46×10^{-3} . 菌糸あり: 5.75×10^{-5} いずれも供与菌と受容菌を掛け合わせた数の平方根あたり	54
根圏	コムギ根圏, 非滅菌 16 h 明条件 20°C, 8 h 暗条件 16°C サイクル	8 d	D: <i>Pseudomonas</i> sp. R2f (RP4) R: <i>Pseudomonas</i> sp. R2f	1.7×10^{-2} 供与菌あたり	75
根圏	非滅菌, オオムギ根圏, 室温	7 d	D: <i>P. putida</i> KT2440:: <i>lacI</i> ^{h1} (pKJK10) R: 土着の細菌	$6.32 \times 10^{-2} \sim 1.12 \times 10^{-1}$ 供与菌あたり	40
根圏	非滅菌, エンドウマメ, オオムギ根圏, 12 h ごとに明, 暗条件サイクル, 20-22°C	6 d	D: <i>P. putida</i> KT2442 (pKJK5:: <i>gfp</i>) R: <i>P. putida</i> LM24	Pea: 4.0×10^{-2} Barley: 5.9×10^{-3} いずれも供与菌あたり	36
根圏	滅菌, ヒエ根圏, 砂+植物, 砂 12 h ごとに明条件 (25°C), 暗条件 (15°C) サイクル	95 h	D: <i>Pseudomonas fluorescens</i> AS12 (pSS501) R: <i>Serratia</i> sp. RF7	根圏: 8.9×10^{-11} 砂+植物: 1.2×10^{-12} 砂: 5.5×10^{-15} いずれも供与菌と受容菌数を掛け合わせた数あたり	25
根圏	非滅菌, コムギ根圏 16 h 明条件 20°C, 8 h 暗条件 16°C サイクル	7 d	D: <i>Pseudomonas</i> sp. R2f (RP4) R: <i>Pseudomonas</i> sp. R2f または土着の細菌	R2f: 7.1×10^{-3} 土着細菌: 1.1×10^{-3} いずれも供与菌あたり	48
根圏	非滅菌, ビート根圏にフィルターを投入, 15-20°C	24 h	D: <i>Pseudomonas marginalis</i> 376N (pQBR11) R: <i>Pseudomonas aureofaciens</i> 381R	$1.3 \times 10^{-8} \sim 5.1 \times 10^{-5}$ 受容菌あたり	29
植物 アルファルファ	非滅菌の種および芽, 22°C	9 d	D: <i>Lactococcus lactis</i> SH4174 R: <i>L. lactis</i> BU-2-60	$1.1 \times 10^{-1} \sim 3.9 \times 10^{-1}$ 受容菌あたり	73
芽 アルファルファ	非滅菌, 芽, 20°C	9 d	D: <i>P. putida</i> LM50 (pKJK5:: <i>gfp</i>), <i>P. putida</i> LM50 (TOL:: <i>gfp</i>) R: 土着の細菌	pKJK5: 3.4×10^{-4} TOL: 2.0×10^{-6} いずれも供与菌あたり	37
葉上	リン酸カリウムバッファー中のマメ植物葉, 温度記載なし	2 d	D: <i>Pseudomonas syringae</i> Cit7p (RP1) R: <i>Pseudomonas syringae</i> Cit7 <i>xylE</i>	1.0×10^{-2} 供与菌あたり	5
土壌+動物	非滅菌土壌, ミミズ, 20°C	14 d	D: <i>Pseudomonas fluorescens</i> C5t (pJP4) R: 土着の細菌	ミミズなし: 2.8×10^{-4} ミミズあり: 6.9×10^{-2} いずれも供与菌あたり	10
土壌+動物	非滅菌土壌, ミミズ, 20°C	14 d	D: <i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP222N (pJP4) R: <i>P. fluorescens</i> C5t	ミミズなし: 伝達せず ミミズあり: $1.9 \times 10^{-6} \sim 2.3 \times 10^{-6}$ いずれも供与菌あたり	11

^a D は供与菌を, R は受容菌を表す。

土壌や水環境におけるプラスミドの挙動解析の中には, プラスミドの接合伝達能を利用して, 環境汚染物質による汚染サイトの浄化を図るために行われた報告例もある。従来, 汚染サイトとは別の場所で単離された, 汚染物質を代謝あるいは分解可能な微生物を汚染サイトに

投入して浄化する手法は, バイオオーグメンテーションとして知られる。しかし, 本手法は, その汚染除去の確度が低いことが問題となっている。これは投与した分解菌が, 土着の微生物との競合によって淘汰され, 本来の分解力を発揮できないことに起因する場合が多い。そこ

表 5. 水環境内におけるプラスミドの接合実験とその伝達頻度

実験環境	実験条件など	実験期間	接合実験に用いた 供与菌・受容菌の組合せ ^a	結果	文献
海水	非滅菌, 37°C	20 h	D: <i>E. coli</i> 15 (pRAB15) R: <i>E. coli</i> K12 185	4.9×10^{-9} 供与菌あたり	8
海水	非滅菌; 6 or 20°C	24 h	D: <i>Vibrio cholerae</i> NVH4122/ <i>E. coli</i> NVH4061 R: <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> AL2027	$3.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-3}$ 受容菌あたり	26
海水	滅菌, 15–20°C 可動性プラスミド pCE328 の伝達頻度を測定	48 h	M and R: 土着細菌 D: <i>E. coli</i> K12 UB1832 (pCE328)	8.5×10^{-6} 供与菌あたり	28
人工海水	滅菌, フィルターを投入, 24–28°C	24 h	D: <i>Vibrio</i> sp. S142 (RP4), <i>E. coli</i> 803 (RP1) R: <i>Vibrio</i> sp. S141	3.6×10^{-2} 受容菌あたり	17
海水, 堆積物	滅菌, 20–23°C	18 d	D: <i>E. coli</i> LCB69 C600 (RP4) R: <i>E. coli</i> LCB402 CGSC 6173	1×10^{-4} 供与菌あたり	6
海水, 堆積物	非滅菌; 15°C	44 d	D: <i>Aeromonas salmonicida</i> 718 (pRAS1) R: 土着の細菌	3.4×10^{-1} 受容菌あたり	52
河川水	滅菌, 20°C	96 h	D: <i>E. coli</i> EC ₁₅ (river water isolate) R: <i>E. coli</i> 416S または J62	1.6×10^{-4} 受容菌あたり	38
河口水 / 堆積物	非滅菌, 20°C	5 d	D: <i>Pseudomonas putida</i> PF015 (pGTE26) または KT2442 (pGTE26) R: <i>P. putida</i> KT2442-nalr, PF015 (pGTE27) または土着の細菌	pGTE27 が PF015 間でのみ伝達 4.8×10^{-2} 受容菌あたり	3
河川の岩に付着した細菌群集	非滅菌, 岩上の細菌群集の上に フィルターをのせる, 10–20°C	24 h	D: 土着細菌のもつ天然の水銀耐性プラスミド R: <i>P. putida</i> KT2440	3.7×10^{-6} 受容菌あたり	2
河川の岩に付着した細菌群集	非滅菌, 岩上の細菌群集の上に フィルターをのせる, 20°C	24 h	D and M: <i>P. putida</i> KT2440 (pD10, pQKH6 または pQKH9) R: <i>P. putida</i> UWC6 または UWC5	pD10 の可動性 Up to 7.2×10^{-4} 受容菌あたり	18
河川水 / ボウフラ	非滅菌, 河川水, 10 または 25°C 滅菌水 + ボウフラ, 明条件 18 h, 暗条件 6 h のサイクル, 25°C	15 d/3 d	D: <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> IPS82 (pBC16), <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> AND931 (pXO16::Tn5401) R: <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> GBJ002/IPS70	河川水: pBC16 は伝達せず pXO16, 10°C 7.7×10^{-4} pXO16, 25°C 3.5×10^{-2} ボウフラ: pBC16 は伝達せず pXO16, 1.0×10^{-3} いずれも供与菌あたり	72
湖水	滅菌および非滅菌, 16–37°C	72 h	D: <i>P. aeruginosa</i> RM2100 (R68.45) または RM2180 (FP5) R: <i>P. aeruginosa</i> RM273 または 土着細菌	滅菌水 R68.45 が RM273 に伝達 2.0×10^{-3} その他は検出されず 供与菌あたり	42
湖水	栄養源のない合成湖水, 21°C	18 h	D: <i>P. aeruginosa</i> PAO4032 (R68.45) R: <i>P. aeruginosa</i> PAO1168 または 土着細菌	土着細菌には伝達せず PAO1168: 6.8×10^{-5} (bulk water) 5.6×10^{-3} (neuston) 供与菌あたり	24
飲料水	滅菌, 25°C 可動性プラスミド pHSV106 の伝達頻度を測定	24 h	M: <i>E. coli</i> ED2149 (R100-1) D: <i>E. coli</i> HB101 (pHSV106) R: <i>E. cloacae</i> 107A	$2.43 \times 10^{-9} \sim 2.14 \times 10^{-7}$ 受容菌あたり	53
汚染水	非滅菌, 廃水処理反応槽, 18–22°C	32 d	D: <i>P. putida</i> KT2442 (pWW0::gfp) R: 土着の細菌	$1.9 \times 10^{-1} \sim 8.9 \times 10^{-1}$ 供与菌あたり	35
下水	濾過滅菌, 22.1°C	31 d	D: <i>P. putida</i> UWC8 (pQKH6), <i>Serratia fonticola</i> IB4r (pQKH6) R: <i>P. putida</i> UWC9	<i>P. putida</i> UWC8: 8.40×10^{-4} <i>Serratia fonticola</i> IB4r: 3.10×10^{-6} いずれも受容菌あたり。	1

^a D は供与菌を, R は受容菌を表す。また, M は可動性プラスミドの伝達を促すヘルパープラスミドをもつ菌株を表す。

で、宿主に汚染物質分解能を与えるプラスミド (=分解プラスミド) の接合伝達を利用して、土着の細菌に分解能を付与し、汚染サイト全体の浄化力を高めることができれば、この問題を解決できるのではないかと考えられた。こうした観点に基づき、IncP-1, P-7, P-9 に属するプラスミドを中心に、宿主に汚染物質の分解能をもたらすプラスミド (=分解プラスミド) についての挙動解析が行われてきた。これらの報告例の詳細については、筆者らの総説⁶¹⁾を参照されたい。近年にも、Inoue らが、高頻度で広範囲の微生物に接合伝達する 2,4-D (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) 分解プラスミド pJP4 (IncP-1) による報告²¹⁾や、Ikuma らによるトルエン・キシレン分解プラスミド pWW0 (IncP-9) を用いた報告^{19,20)}がある。いずれも、汚染物質の残存量変化とともに、プラスミドの接合伝達についてもモニタリングを行い、実際にプラスミドの伝達が生じ、対照と比べて早く汚染除去ができることを報告している。また筆者らは、ダイオキシンの構造類縁体である、カルバゾールに対する分解プラスミド、pCAR1 について、人為的に汚染したモデル環境を準備して、同様にモニタリングを行った^{58,60)}。その結果、pCAR1 は水環境でのみ接合伝達が生じ、接合完了体もカルバゾールの分解に寄与することが判明した。また、その接合伝達には、環境試料中の二価陽イオンの Mg^{2+} と Ca^{2+} を必要とすることも明らかにした⁶⁰⁾。

5.3 動物の体内・腸内におけるプラスミドの接合伝達

前述の土壌・水環境と異なり、ヒトを含む動物の体内、特に腸内は、栄養源が豊富であり、極めて多様な微生物集団が高密度に生息する。また微生物が動物個体との共生関係にある場合も多い。近年のメタゲノム解析から、ヒト腸内細菌由来の可動性遺伝因子について、培養を介さずに検出することが可能になった。その結果、腸内細菌から新たなプラスミドが見出された²³⁾。また、ヒトの口腔内の細菌からもプラスミドが見出されたり、昆虫腸内に共生する培養不能な細菌にもプラスミドが見出されたり⁷⁷⁾している。従って、動物体内でもプラスミドの接合伝達は生じる可能性が高い。実際、ミミズを入れた土壌内では、ミミズを入れていない土壌に比べて、プラスミドの接合伝達頻度が上昇したという報告⁶⁹⁾や、昆虫の腸内でプラスミド伝搬が生じた¹¹⁾という報告もある(表5)。また、水環境や腸内環境に普遍的に存在する繊毛虫が食作用によって細菌を取り込み、プラスミドの伝播を促進する³³⁾という報告もある(表5)。

以上に挙げた、環境中におけるプラスミドの接合伝達性を調べた報告例において重要なことは、供与菌の種類、環境試料、環境条件(温度、時間、他の生物の存在等)によって結果が大きく左右される点である。例えば、広宿主域プラスミドとして知られる RP4 (IncP-1 = IncP 群, 表1, 2) について、多くの報告があるが、その接合伝達頻度は供与菌あたりでも、受容菌あたりでも 10^{-2} ~ 10^{-4} という値が示されている。これに対し、狭宿主域プラスミドとされる pWW0(または TOL, IncP-9 群, 表2) は、環境によっては供与菌あたり 10^{-1} と RP4 よりも高い頻度で伝達するとされる一方、その頻度が 10^{-6} 程度という結果もあり、同じプラスミドであってもその頻度に 10^5 もの違いが生じている(表4)。このことは、

現状のデータからは、環境中で、どのプラスミドがどの程度の頻度で伝達するのかという見積もりが非常に難しいことを意味する。

6. 培養法に依存しないプラスミドの挙動解析

従来は、接合完了体が選択培地上でコロニーを形成するかどうか、またはコロニーが蛍光を示すかどうかによって、接合伝達の可否を判別することが多かった。しかし、先述したように、自然環境中に生息する微生物の大半は難培養性・未培養であることから、培養法に依存した挙動解析には大きなバイアスがかかることが懸念される。こうした観点から、近年、培養を介さず、接合伝達が生じた直後に、その場 (*in situ*) での検出、すなわち細胞レベルで接合完了体を検出する手法が導入されつつある⁶⁵⁾。前述したシステムによって蛍光を示す微生物細胞を、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察することで、活性汚泥内のフロックやバイオフィームなど、より立体的な構造を作る微生物集団内であっても、プラスミドの接合伝達を検出することが可能になってきた⁶⁵⁾。また、接合完了体の蛍光を検出した後に、その細胞を分離して解析し、どのような細菌に接合伝達したのかを調べた報告もある。Smets らのグループでは、マイクロマンピュレーターを用いて環境試料中からプラスミドの接合伝達体を細胞レベルで取得し、解析することに成功した³⁹⁾。また、微生物を細胞レベルで高速に分離・取得する方法として、フローサイトメトリー (FCM) が用いられつつある。FCM は細胞などの粒子 1 個ずつを、シース液とよばれる流体に分散させ、流体を細く流すことで、個々の粒子を光学的に分析する手法のことである。細胞粒子の大きさ・密度等の形態の情報や、染色した DNA、または蛍光タンパク質等の蛍光についての情報を、毎秒数千個以上の速度で取得し、それらの相関を解析するヒストグラムとして作成し、さらに目的の細胞集団などを毎秒に数千個以上の速度で分取することができる。既に FCM を用いて環境試料中からプラスミドの接合伝達体を細胞レベルで取得したという報告もなされている⁴⁰⁾。これらの研究では、得られた接合完了体を培養してから遺伝子解析に供しているため、培養不能な細菌までを対象にはしていないが、それでも、これまでに宿主として知られていなかった細胞を得ることに成功している。

筆者らは、FCM によって蛍光を示す細胞を分離した後、その細胞に対して $\phi 29$ 由来の DNA ポリメラーゼによる等温反応での全ゲノム DNA 増幅 (WGA: whole genome amplification) を行うことで、分離した細胞を培養することなく、遺伝子解析に供することを可能にした⁵⁹⁾。本手法では、細胞レベルで分離した接合完了体について、プラスミドをもつことを PCR によって確認し、さらにその細胞の 16S rRNA 遺伝子の配列を決定することで、どのような細菌がプラスミドを受け取ったのかを、同時に明らかにできる。この方法で、従来広宿主域プラスミドとして知られ、*Proteobacteria* 門に属する細菌に接合伝達する pBP136 (IncP-1)、狭宿主域プラスミドとして知られ、主に *Pseudomonas* 属細菌間を接合伝達する pCAR1 (IncP-7)、およびそれらの中間の性質を示す

と考えられ、*Pseudomonas* 属細菌と、大腸菌を宿主とできる NAH7 (IncP-9) を用い、それらの宿主域を調べた。その結果、pBP136 については、*Proteobacteria* 門以外の *Actinobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門に属する細菌を、pCAR1、NAH7 については *Pseudomonas* 属細菌とは細菌綱レベルで異なる細菌を宿主として取得し、従来の培養法に依存する手法では宿主として得られなかった細菌を宿主として得ることに成功した⁵⁹⁾。得られた宿主には、細胞分裂するとプラスミドを維持できない「一過的な」宿主も存在することも示唆され、プラスミドを他の細菌に移す際の「仲介役」にもなる可能性も示された⁵⁹⁾。

7. おわりに

プラスミドの研究は、詳細な分子機構が明らかになっている面と、まだ不明な点の多い面とが混在している。ある細菌細胞内における挙動については調べられていたとしても、宿主が変わるだけで、その挙動が大きく変化する場合も少なくない。従って、プラスミド研究は、古く新しい分野の一つということができそうである。特に、近年のシーケンス技術の革新と、微生物の細胞レベルでの分離・解析技術の進展によって、新たな局面を迎えているといえる。例えば、次々に発見される新規なプラスミドについても、その宿主域の調査が可能になる。また、塩基配列情報の蓄積に伴い、バイオインフォマティクス分野との連携も重要と考えられる。Suzuki らは、IncF、IncH、IncI、IncN、IncP および IncW プラスミドの塩基配列と、他の細菌のゲノム配列情報から、プラスミドと染色体の塩基組成に基づく非類似度を計算、比較し、それらの進化の過程における宿主域についての子測結果を報告している⁶⁰⁾。こうした情報と実験的に調査した宿主域とをすり合わせることで、新たな宿主-ベクター系を構築できれば、これまで解析の難しかった細菌の解析ツールとして利用できるかと期待される。また、これまではいわばブラックボックスであった、環境中の複合微生物系におけるプラスミドの接合伝達現象についても徐々に研究が進められつつある。こうした難培養性・未培養細菌を含む複合微生物系内におけるプラスミドの挙動解析・宿主域の解析は、開放系における微生物利用のリスク評価を含め、今後の環境バイオテクノロジー分野においても非常に重要と考えられる。

謝 辞

本奨励賞に推薦頂きました福田雅夫先生（長岡技術科学大学生物系教授）に深く感謝申し上げます。また本総説で紹介しました研究の場を与えて頂き、ご指導・ご助言頂きました大森俊雄先生（東京大学名誉教授）、山根久和先生（東京大学名誉教授、現・帝京大学理工学部教授）、野尻秀昭先生（東京大学生物生産工学研究センター教授）、大熊盛也先生（独立行政法人理化学研究所 BRC-JCM 室長）、金原和秀先生（静岡大学大学院工学研究科教授）をはじめとする諸先生方に深く感謝申し上げます。また、ご助力・ご支援頂きました学生・技術職員の皆様方に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ashelford, K.E., M.A. Learner, and J.C. Fry. 2001. Gene transfer and plasmid instability within pilot-scale sewage filter beds and the invertebrates that live in them. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 197-205.
- 2) Bale, M.J., M.J. Day, and J.C. Fry. 1988. Novel method for studying plasmid transfer in undisturbed river epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2756-2758.
- 3) Barkay, T., N. Kroer, L.D. Rasmussen, and S.J. Sørensen. 1995. Conjugal transfer at natural-population densities in a microcosm simulating an estuarine environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 43-53.
- 4) Binh, C., H. Heuer, M. Kaupenjohann, and K. Smalla. 2008. Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66: 25-37.
- 5) Björklöf, K., A. Suoniemi, K. Hahtela, and M. Romantschuk. 1995. High frequency of conjugation versus plasmid segregation of RP1 in epiphytic *Pseudomonas syringae* populations. *Microbiology* 141: 2719-2727.
- 6) Breittmayer, V.A. and M.J. Gauthier. 1990. Influence of glycine betaine on the transfer of plasmid RP4 between *Escherichia coli* strains in marine-sediments. *Lett. Appl. Microbiol.* 10: 65-68.
- 7) Christensen, B., C. Sternberg, J. Andersen, L. Eberl, S. Møller, M. Givskov, and S. Molin. 1998. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2247-2255.
- 8) Combarro, M.P., M.J. Gauthier, and V.A. Breittmayer. 1992. Conjugal transfer of R plasmids between *Escherichia coli* strains on saline selective media and in seawater. *J. Microbiol. Methods.* 14: 207-215.
- 9) Crippen, T.L. and T.L. Poole. 2009. Conjugal transfer of plasmid-located antibiotic resistance genes within the gastrointestinal tract of lesser mealworm larvae, *Alphitobius diaperinus* (*Coleoptera: Tenebrionidae*). *Foodborne Pathog. Dis.* 6: 907-915.
- 10) Daane, L.L., J.A.E. Molina, E.C. Berry, and M.J. Sadowsky. 1996. Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 515-521.
- 11) Daane, L.L., J.A.E. Molina, and M.J. Sadowsky. 1997. Plasmid transfer between spatially separated donor and recipient bacteria in earthworm-containing soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 679-686.
- 12) Davey, M.E. and G.A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- 13) de la Cruz-Perera, C.I., D.W. Ren, M. Blanchet, L. Dendooven, R. Marsch, S.J. Sørensen, and M. Burmolle. 2013. The ability of soil bacteria to receive the conjugative IncP1 plasmid, pKJK10, is different in a mixed community compared to single strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 338: 95-100.
- 14) Frost, L.S. and G. Koraimann. 2010. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol.* 5: 1057-1071.
- 15) Frost, L., R. Leplae, A. Summers, and A. Toussaint. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 722-732.
- 16) Goessweiner-Mohr, N., K. Arends, W. Keller, and E. Grohmann. Conjugative type IV secretion systems in Gram-positive bacteria. *Plasmid.* in press.
- 17) Goodman, A.E., E. Hild, K.C. Marshall, and M. Hermansson. 1993. Conjugative plasmid transfer between bacteria under simulated marine oligotrophic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1035-1040.
- 18) Hill, K.E., J.C. Fry, and A.J. Weightman. 1994. Gene transfer in the aquatic environment persistence and mobilization of the

- catabolic recombinant plasmid pD10 in the epilithon. *Microbiology* 140: 1555–1563.
- 19) Ikuma, K. and C.K. Gunsch. 2013. Functionality of the TOL plasmid under varying environmental conditions following conjugal transfer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 395–408.
 - 20) Ikuma, K., R.M. Holzem, and C.K. Gunsch. 2012. Impacts of organic carbon availability and recipient bacteria characteristics on the potential for TOL plasmid genetic bioaugmentation in soil slurries. *Chemosphere* 89: 158–163.
 - 21) Inoue, D., Y. Yamazaki, H. Tsutsui, K. Sei, S. Soda, M. Fujita, and M. Ike. 2012. Impacts of gene bioaugmentation with pJP4-harboring bacteria of 2,4-D-contaminated soil slurry on the indigenous microbial community. *Biodegradation*. 23: 263–276.
 - 22) Jensen, L.B., L. Garcia-Migura, A.J. Valenzuela, M. Løhr, H. Hasman, and F.M. Aarestrup. 2010. A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J. Microbiol. Methods*. 80: 25–43.
 - 23) Jones, B.V., F. Sun, and J.R. Marchesi. 2010. Comparative metagenomic analysis of plasmid encoded functions in the human gut microbiome. *BMC Genomics*. 11: 46.
 - 24) Jones, G.W., L. Baines, and F.J. Genthner. 1991. Heterotrophic bacteria of the fresh water neuston and their ability to act as plasmid recipients under nutrient deprived conditions. *Microb. Ecol.* 22: 15–25.
 - 25) Kroer, N., T. Barkay, S. Sørensen, and D. Weber. 1998. Effect of root exudates and bacterial metabolic activity on conjugal gene transfer in the rhizosphere of a marsh plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 375–384.
 - 26) Kruse, H. and H. Sørum. 1994. Transfer of multiple-drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4015–4021.
 - 27) Lawley, T., B.M. Wilkins, and L.S. Frost. 2004. Bacterial conjugation in Gram-negative bacteria. pp. 203–226. In G. Phillips and B. Funnell (eds.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, DC, USA.
 - 28) Lebaron, P., N. Batailler, and B. Baleux. 1994. Mobilization of a recombinant nonconjugative plasmid at the interface between waste water and the marine coastal environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15: 61–70.
 - 29) Lilley, A.K., J.C. Fry, M.J. Day, and M.J. Bailey. 1994. *In situ* transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp in sugar-beet rhizosphere. *Microbiology* 140: 27–33.
 - 30) Lozano, C., L. García-Migura, C. Aspiroz, M. Zarazaga, C. Torres, and F.M. Aarestrup. 2012. Expansion of a plasmid classification system for Gram-positive bacteria and determination of the diversity of plasmids in *Staphylococcus aureus* strains of human, animal, and food origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 5948–5955.
 - 31) Ma, Y., I.T. Paulsen, and B. Palenik. 2012. Analysis of two marine metagenomes reveals the diversity of plasmids in oceanic environments. *Environ. Microbiol.* 14: 453–466.
 - 32) Maher, D. and D.E. Taylor. 1993. Host range and transfer efficiency of incompatibility group HI plasmids. *Can. J. Microbiol.* 39: 581–587.
 - 33) Matsuo, J., S. Oguri, S. Nakamura, T. Hanawa, T. Fukumoto, Y. Hayashi, K. Kawaguchi, Y. Mizutani, T. Yao, K. Akizawa, H. Suzuki, C. Simizu, K. Matsuno, S. Kamiya, and H. Yamaguchi. 2010. Ciliates rapidly enhance the frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles. *Res Microbiol.* 161: 711–719.
 - 34) McCarthy, A.J. and J.A. Lindsay. 2012. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. *BMC Microbiol.* 12: 104.
 - 35) Mohan, S.V., C. Falkentoft, Y.V. Nancharaiyah, B.S.M. Sturm, P. Wattiau, P.A. Wilderer, S. Wuertz, and M. Hausner. 2009. Bioaugmentation of microbial communities in laboratory and pilot scale sequencing batch biofilm reactors using the TOL plasmid. *Bioresour. Technol.* 100: 1746–1753.
 - 36) Mølbak, L., S. Molin, and N. Kroer. 2007. Root growth and exudate production define the frequency of horizontal plasmid transfer in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59: 167–176.
 - 37) Mølbak, L., T.R. Licht, T. Kvist, N. Kroer, and S.R. Andersen. 2003. Plasmid transfer from *Pseudomonas putida* to the indigenous bacteria on alfalfa sprouts: characterization, direct quantification, and *in situ* location of transconjugant cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5536–5542.
 - 38) Muela, A., M. Pocino, I. Arana, J.I. Justo, J. Iriberry, and I. Barcina. 1994. Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4273–4278.
 - 39) Musovic, S., A. Dechesne, J. Sørensen, and B.F. Smets. 2010. Novel assay to assess permissiveness of a soil microbial community toward receipt of mobile genetic elements. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 4813–4818.
 - 40) Musovic, S., G. Oregaard, N. Kroer, and S. Sørensen. 2006. Cultivation-independent examination of horizontal transfer and host range of an IncP-1 plasmid among gram-positive and gram-negative bacteria indigenous to the barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6687–6692.
 - 41) Niki, H. and S. Hiraga. 1997. Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell division cycle in *E. coli*. *Cell*. 90: 951–957.
 - 42) O'morchoe, S.B., O. Ogunseitan, G.S. Sayler, and R.V. Miller. 1988. Conjugal transfer of R6845 and Fp5 between *Pseudomonas aeruginosa* strains in a fresh water environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1923–1929.
 - 43) Palmer, K.L., V.N. Kos, and M.S. Gilmore. 2010. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 632–639.
 - 44) Pasmore, M. and J.W. Costerton. 2003. Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 407–413.
 - 45) Pinto, U.M., K.M. Pappas, and S.C. Winans. 2012. The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 755–765.
 - 46) Pukall, R., H. Tschape, and K. Smalla. 1996. Monitoring the spread of broad host and narrow host range plasmids in soil microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20: 53–66.
 - 47) Rajewska, M., K. Wegrzyn, and I. Konieczny. 2012. AT-rich region and repeated sequences—the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol. Rev.* 36: 408–434.
 - 48) Richaume, A., E. Smit, G. Faurie, and J.D. van Elsas. 1992. Influence of soil type on the transfer of plasmid RP4p from *Pseudomonas fluorescens* to introduced recipient and to indigenous bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 101: 281–292.
 - 49) Richaume, A., J.S. Angle, and M.J. Sadowsky. 1989. Influence of soil variables on *in situ* plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1730–1734.
 - 50) Rochelle, P.A., J.C. Fry, and M.J. Day. 1989. Factors affecting conjugal transfer of plasmids encoding mercury resistance from pure cultures and mixed natural suspensions of epilithic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 135: 409–424.
 - 51) Rosvoll, T.C., T. Pedersen, H. Sletvold, P.J. Johnsen, J.E. Sollid, G.S. Simonsen, L.B. Jensen, K.M. Nielsen, and A. Sundsfjord. 2010. PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHTbeta-related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 58: 254–268.
 - 52) Sandaa, R.A. and O. Enger. 1994. Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4234–4238.
 - 53) Sandt, C.H. and D.S. Herson. 1991. Mobilization of the ge-

- netically engineered plasmid pHSV106 from *Escherichia coli* HB101(pHSV106) to *Enterobacter cloacae* in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 194–200.
- 54) Sengeløv, G., G.A. Kowalchuk, and S.J. Sørensen. 2000. Influence of fungal-bacterial interactions on bacterial conjugation in the residuesphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 39–45.
- 55) Sepulveda, E., J. Vogelmann, and G. Muth. 2011. A septal chromosome segregator protein evolved into a conjugative DNA-translocator protein. *Mob. Genet. Elements.* 1: 225–229.
- 56) Shintani, M., H. Habe, M. Tsuda, T. Omori, H. Yamane, and H. Nojiri. 2005. Recipient range of IncP-7 conjugative plasmid pCAR2 from *Pseudomonas putida* HS01 is broader than from other *Pseudomonas* strains. *Biotechnol. Lett.* 27: 1847–1853.
- 57) Shintani, M. and H. Nojiri. 2013. Mobile genetic elements (MGEs) carrying catabolic genes. pp. 167–214. In A. Malik, E. Grohmann, and M. Alves (eds.), *Management of Microbial Resources in the Environment*, Springer, Holland.
- 58) Shintani, M., H. Yamane, and H. Nojiri. 2010. Behavior of various hosts of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial microcosms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 343–349.
- 59) Shintani, M., K. Matsui, J.I. Inoue, A. Hosoyama, S. Ohji, A. Yamazoe, H. Nojiri, K. Kimbara, and M. Ohkuma. Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, in press.
- 60) Shintani, M., K. Matsui, T. Takemura, H. Yamane, and H. Nojiri. 2008. Behavior of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 485–497.
- 61) Shintani, M., Y. Takahashi, H. Yamane, and H. Nojiri. 2010. The behavior and significance of degradative plasmids belonging to Inc groups in *Pseudomonas* within natural environments and microcosms. *Microb. Environ.* 25: 253–265.
- 62) Smillie, C., M.P. Garcillán-Barcia, M.V. Francia, E.P. Rocha, and F. de la Cruz. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 434–452.
- 63) Sobczyk, P.A. and T.H. Hazen. 2009. Horizontal gene transfer and mobile genetic elements in marine systems. *Methods Mol. Biol.* 532: 435–453.
- 64) Sørensen, S.J., T. Schyberg, and R. Ronn. 1999. Predation by protozoa on *Escherichia coli* K12 in soil and transfer of resistance plasmid RP4 to indigenous bacteria in soil. *Soil Ecol.* 11: 79–90.
- 65) Sørensen, S.J., M. Bailey, L.H. Hansen, N. Kroer, and S. Wuertz. 2005. Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 700–710.
- 66) Sota, M. and E. Top. 2008. Horizontal gene transfer mediated by plasmids. In G. Lipps (ed.), *Plasmids: Current Research and Future Trends*. Horizon Scientific Press, Caister Academic Press, U. K.
- 67) Suzuki, H., H. Yano, C.J. Brown, and E.M. Top. 2010. Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature. *J. Bacteriol.* 192: 6045–6055.
- 68) Taylor, D.E., A. Gibreel, T.D. Lawley, and D.M. Tracz. 2004. Antibiotic resistance plasmids. pp. 473–491. In G. Phillips and B. Funnell (eds.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, DC., USA.
- 69) Thimm, T., A. Hoffmann, I. Fritz, and C.C. Tebbe. 2001. Contribution of the earthworm *Lumbricus rubellus* (*Annelida, Oligochaeta*) to the establishment of plasmids in soil bacterial communities. *Microb. Ecol.* 41: 341–351.
- 70) Thoma, L. and G. Muth. 2012. Conjugative DNA transfer in *Streptomyces* by TraB: is one protein enough? *FEMS Microbiol. Lett.* 337: 81–88.
- 71) Thomas, C.M. and A.S. Haines. 2004. Plasmids of the genus *Pseudomonas*. In J.L. Ramos (ed.), *Pseudomonas*. Plenum Publishing Corporation, New York, USA.
- 72) Thomas, D.J.I., J.A.W. Morgan, J.M. Whipps, and J.R. Saunders. 2001. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 330–338.
- 73) Toomey, N., A. Monaghan, S. Fanning, and D. Bolton. 2009. Transfer of antibiotic resistance marker genes between lactic acid bacteria in model rumen and plant environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3146–3152.
- 74) van Elsas, J.D., J.C. Fry, P. Hirsch, and S. Molin. 2000. Ecology of plasmid transfer and spread. pp. 175–206. In C.M. Thomas (ed.), *The horizontal gene pool*. Harwood Scientific Publisher, Amsterdam, Holland.
- 75) van Elsas, J.D., J.T. Trevors, and M.E. Starodub. 1988. Bacterial conjugation between *Pseudomonads* in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 299–306.
- 76) Vogelmann, J., M. Ammelburg, C. Finger, J. Guezzuez, D. Linke, M. Flötenmeyer, Y.D. Stierhof, W. Wohlleben, and G. Muth. 2011. Conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* resembles bacterial chromosome segregation by FtsK/SpoIIIE. *EMBO J.* 30: 2246–2254.
- 77) Warburton, P.J., E. Allan, S. Hunter, J. Ward, V. Booth, W.G. Wade, and P. Mullany. 2011. Isolation of bacterial extrachromosomal DNA from human dental plaque associated with periodontal disease, using transposon-aided capture (TRACA). *FEMS Microbiol. Ecol.* 78: 349–354.
- 78) Wuertz, S., L. Hendrickx, M. Kuehn, K. Rodenacker, and M. Hausner. 2001. *In situ* quantification of gene transfer in biofilms. *Method Enzymol.* 336: 129–143.
- 79) Yano, H., M. Miyakoshi, K. Ohshima, M. Tabata, Y. Nagata, M. Hattori, and M. Tsuda. 2010. Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids. *J. Bacteriol.* 192: 4337–4347.
- 80) 山口隆司, 山口剛土, 幡本将史, 中村明靖, 川上周司, 久保田健吾. 2013. 微生物検出向け新規高感度 FISH 法の開発, pp. 75–88, 渡辺一哉監修, 微生物燃料電池による排水処理システム最前線, エヌ・ティー・エス出版.