

総説

土壤生態系における細胞外 DNA 分子の挙動 第 1 部：土壌および土壌構成物質への DNA 分子の吸着

佐伯和利¹・境 雅夫^{2*}・國頭 恭³

¹九州大学生物環境調節センター, 〒 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1
²鹿児島大学農学部生物資源化学科, 〒 890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-24
³信州大学理学部物質循環学科, 〒 390-8621 長野県松本市旭 3-1-1

Fate of extracellular DNA molecules in soil eco-system Part 1: Adsorptions of DNA on soils and soil constituents

Kazutoshi Saeki¹, Masao Sakai^{2*} and Takashi Kunito³

¹Biotron Institute, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan
²Department of Biochemical Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University,
1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan
³Department of Environmental Sciences, Faculty of Science, Shinshu University,
3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan

Key words : DNA adsorption, clay, soil, allophane, Andosols

1. はじめに

遺伝的に修飾された微生物や植物の利用の増加に伴い、遺伝子組換え生物 (GMOs) の安全性に大きな注目が集まっている。安全性を評価する上で最も重要な点は、作物と微生物との間で起こる遺伝情報の形質導入・転換である。そのため、GMOs が生態系へ与える影響を推測するためには、土壌中での DNA の存在状態 (吸着) と水平伝播 (形質転換等) の頻度 (図 1) を理解することが重要である。

本総説では、第 1 部で、土壌構成成分への細胞外 DNA の吸着についてまとめる。第 2 部では、細胞外 DNA が土壌中で安定に残存するメカニズムすなわち、吸着 DNA のヌクレアーゼに対する抵抗性と、細胞外 DNA の形質転換について概説する。

1) 土壌および土壌構成物質への DNA 吸着の解析の重要性

細胞外 DNA 分子の土壌および土壌構成物質への吸着に関する知識は、以下の 3 つの課題に必要である。1 つ目は、前節でも紹介した「遺伝子組換え生物の生態系への影響」であり、2 つ目が「土壌からの DNA 抽出法に関する問題点」、3 つ目が「生命の起源に関わる粘土の役割」である。(1) 遺伝子組換え生物の生態系への影響

以前は、土壌中で死滅した微生物から放出される核酸物質は、ヌクレアーゼによって速やかに分解されると考えられていた (Lorenz and Wackernagel, 1994)。しかし現在では、様々な微生物や植物から放出された核酸物質は、粘土や砂、

土壌粒子に吸着されることによって、ヌクレアーゼへの反応性・感受性を変えて、分解抵抗性を示すようになることが報告されている (Lorenz and Wackernagel, 1994)。さらに、放出された DNA 分子は、粘土鉱物や他の物質に結合した状態でも、コンピテント細胞を形質転換する能力を持つと考えられている (Khanna and Stotzky, 1992; Gallori *et al.*, 1994; Crecchio and Stotzky, 1998; Stotzky, 2000)。

Hoffmann *et al.* (1998) は、GMOs の外来遺伝子が、微生物間だけで形質転換を起こすのではなく、作物と微生物の間でも組み換えや複製、形質導入、転換、置換を起こすことを報告している。また、土壌中の細胞外 DNA は、微生物間の遺伝的情報交換や、土壌微生物の多様性において重要な役割を担っている (Khanna and Stotzky, 1992; Stotzky, 2000)。このような背景から、土壌中の細胞外 DNA の存在状態や水平伝播の頻度を明らかにすることは重要な意義をもつ。土壌中の DNA 動態の解明には、第一義的に、土壌構成成分への DNA 分子の吸着の様式を把握する必要がある。土壌への細胞外 DNA の吸着についての理解は、GMOs が土壌生態系へ与える影響を評価するために重要であり、また土壌微生物の進化や遺伝的多様性の維持機構の解明にも役立つ。

(2) 土壌からの DNA 抽出の問題点

土壌 1 g 当たり最大で 100 億もの細菌が存在しており、その種類は数万にも及ぶとされている (Roesch *et al.*, 2007)。しかし、その中で培養可能な微生物は僅か 0.1 から 1% であることが知られており、大部分の培養できない微生物は VBNC (viable but nonculturable) 微生物とよばれている。これら VBNC 微生物は従来の培養法では研究できない

2010 年 1 月 29 日受付・2010 年 5 月 6 日受理

* Corresponding author.

E-mail: msakai@ms.kagoshima-u.ac.jp

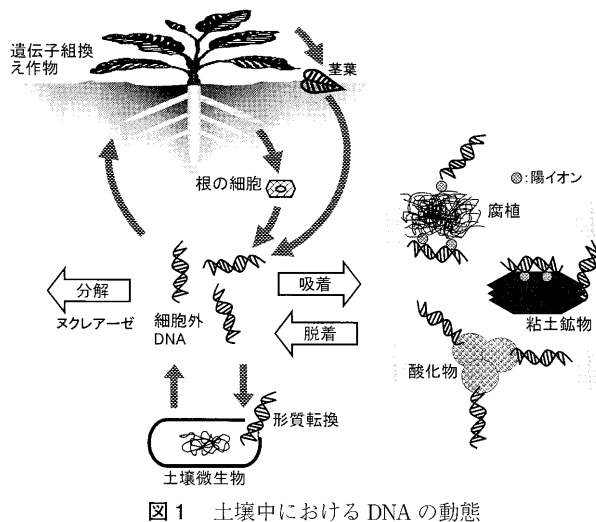


図1 土壤中におけるDNAの動態

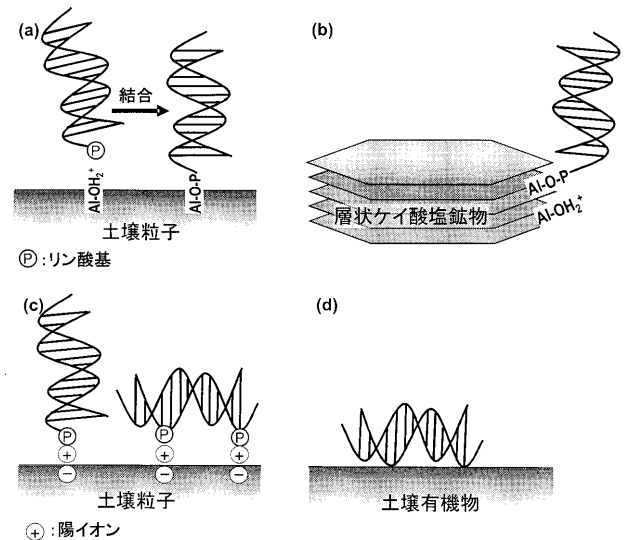


図2 土壤粒子へのDNA吸着機構 (Saeki and Sakai (2009) をもとに一部改変)

め、土壤からDNAを直接抽出・解析するアプローチがとられている。土壤から直接抽出したDNAを用いたVBNC微生物の研究は、土壤中における未知の微生物の多様性と機能を理解する上で重要である。

細胞外DNAが粘土鉱物や有機物などの土壤構成成分によって固定されるため、DNA抽出が困難な土壤もある。日本に広く分布する火山灰土壤(黒ボク土壤)は、他の土壤に比べてアロフェンなどの非晶質鉱物や酸化物を多く含んでいる土壤であるが、DNA抽出が特に困難であり、非培養法による微生物群集解析の障害となっている。そのため黒ボク土からの効率的なDNA抽出法の開発が必要である。したがって、土壤へのDNA吸着メカニズムの解析は、土壤からのDNA抽出効率を改善するうえでも重要である(星野・長谷部, 2005)。

(3) 生命の起源と粘土

1951年に発表されたJ. D. Bernalの「生命起源関連高分子化合物の規則的合成に粘土鉱物が重要な役割を果たしている」という説が発端になり、核酸を含む有機分子の粘土鉱物への吸着に関する実験・研究が盛んになった(例: Greaves and Wilson, 1969; Franchi *et al.*, 1999)。これらの研究から、粘土表面が地球での生命の化学進化にかかわっている可能性があると考えられるようになってきた(Hazen, 2001)。この研究動機のため、土壤構成成分の中で、モンモリロナイトのような層状ケイ酸塩鉱物に対する核酸物質の吸着に関する研究例が多い。

2) 土壤粒子へのDNA吸着モデル

以下の構成としては、まず、層状ケイ酸塩鉱物、酸化物、腐植物質等の各種土壤構成成分に対するDNA分子の吸着を概説する。特に、研究が進んでいるモンモリロナイトとカオリナイト(層状ケイ酸塩鉱物)に対するDNA吸着を詳説する。その後、各種成分の混合系としての土壤粒子に対するDNA分子の吸着をまとめる。

以下の各論の理解を助けるために、著者らが想定している細胞外naked DNA分子の土壤粒子への吸着機構・様式を図2に示した。図の各吸着機構を簡単に述べる。1つ

目は、図2(a)で示した土壤粒子上のDNA吸着反応で、DNA分子末端のリン酸基が土壤粒子の鉄・アルミニウム酸化物のOH基に結合する機構である。同様に、モンモリロナイトなどの層状ケイ酸塩鉱物の結晶末端のアルミニウム酸化物のOH基へのDNA分子の吸着機構(図2(b))が提案されている(Khanna *et al.*, 1998; Paget and Simonei, 1994)。2つ目は、図2(c)に示した陽イオンが架橋として使用される、腐植物質を含めた土壤粒子外表面での吸着形態である。3つ目は、図2(d)のような有機物同士の結合ないしは凝集沈着である。

2. 層状ケイ酸塩鉱物へのDNA分子の吸着様式

線状DNAの粘土鉱物への吸着様式は、2つに大別できる。1つ目は、線状DNA分子の片方の末端が粘土鉱物縁部の末端部位に吸着し、もう一方が外部へ伸びているというものである。2つ目は、DNA分子が粘土の外部平坦面に幾つかの部位で吸着し、吸着していない部分がループ状になったもの(train/loop model)である。前者の様式は図2(b)に対応し、後者(図2(c))よりもDNAが強く吸着することが知られている(Nielsen *et al.*, 2006)。

1) インターカーレーション

膨張格子型鉱物では、層間にDNA分子が侵入する場合がある。しかし、特にモンモリロナイトに関しては、層間にDNA分子が侵入するかどうかについては一致した結果が得られていない。Khanna *et al.* (1998)がpH 1~9の範囲で行った線状DNAの吸着実験では、モンモリロナイトの層間にDNAは侵入しなかった。また、染色体DNAとプラスミドDNA、RNAを用いた場合でも、いずれもモンモリロナイトの層間に侵入しなかった(Pietramellara *et al.*, 1997; Franchi *et al.*, 1999)。対照的に、Greaves and Wilson (1969)では、pH < 5.0では、DNAはモンモリロナイトの層間に侵入し、層間と外部平坦面の両方に吸着することを示唆した。Beall *et al.* (2009)はX線回折と分子モデリ

ングを用いて、一本鎖 DNA がモンモリロナイトの層間に侵入することを示し、層間に DNA が侵入しなかった過去の研究例では、粘土に対する DNA 量が少なかったことが原因であると指摘している。例えば、Khanna *et al.* (1998) で使用した DNA 量はモンモリロナイト 1 mg に対して 0.030 mg であり、Greaves and Wilson (1969) のモンモリロナイト 1 mg に DNA を 0.20 mg 用いたのと比較すると一桁少ない。今後、モンモリロナイト層間への DNA 侵入について、添加 DNA 量を再検討する必要があるだろう。モンモリロナイト以外では、層状複水酸化物 (LDH) の一つである $Mg_2Al(NO_3)$ の層間に、DNA が NO_3^- と置換して侵入することが示されている (Choy *et al.*, 1999)。

2) DNA の形状による影響

DNA の形状によっても、鉱物への吸着特性は変化する。一般に、低分子量の DNA が粘土に多く吸着することが知られている (Pietramellara *et al.*, 2001)。Pietramellara *et al.* (1997) によると、染色体 DNA よりプラスミド DNA のほうが粘土 (モンモリロナイトとカオリナイト) に強く結合した。またモンモリロナイトとカオリナイトへの DNA 吸着量は、DNA 分子の GC 含量や、末端形状が平滑末端 (blunt end) であるか、付着末端 (cohesive end) であるかは関係しなかった (Pietramellara *et al.*, 2001)。

超らせん (super-coiled) 構造 (閉環状) DNA と線状 DNA のいずれが吸着しやすいかについては、一致した結果が得られていない。Wackernagel (2006) によると、超らせん構造 DNA よりも、線状 DNA の方が多く吸着する傾向がある。Franchi *et al.* (1999) の結果では、サイズの大きい線状 DNA が、サイズの小さい超らせん構造 DNA よりもモンモリロナイトとカオリナイトに多く吸着した。Franchi *et al.* (1999) と Franchi and Gallori (2004) によると、線状の長い DNA 分子は、粘土鉱物縁辺の末端部位のいくつかの箇所吸着してループ状になっていたが、プラスミド DNA のようにコンパクトな形状をした場合は、外部平坦面に吸着していた。一方、Nielsen *et al.* (2006) によると、概して、低分子量の超らせん構造 DNA は、粘土鉱物の縁辺末端部位に量は少ないが強く吸着するのに対し、高分子量の線状 DNA は、外部平坦面に、量は多いが弱く吸着する。しかし例外もあり、モンモリロナイトへの吸着の強さは次の順であった (Gallori *et al.*, 1994)：直線状プラスミド DNA (プラスミド DNA を切断し、直線状にしたもの) > 閉環状 (超らせん構造をとる) プラスミド DNA > 染色体 DNA > 直線状の多量体プラスミド DNA (切断したプラスミド DNA を、リガーゼで複数結合させたもの)。シリカの場合は、超らせん構造 DNA より線状 DNA の方が親和性が高かった (Melzak *et al.*, 1996)。砂への吸着量は、線状 DNA と閉環状 (open circular) DNA (超らせん構造の一部が切れているもの) とは同程度であったが、超らせん構造 DNA の吸着量は少なかった (Romanowski *et al.*, 1991)。染色体の線状 DNA のイライトとカオリナイトへの吸着では、DNA 濃度を高くすると多くの DNA が吸着したが、閉環状プラスミド DNA の場合は、おそらくは DNA が凝集するこ

とによって、その吸着量は低下した (Poly *et al.*, 2000)。

3) 吸着形態の観察

走査型電子顕微鏡による観察では、閉環状プラスミド DNA は最も外部に露出している構造上の接点で 2 つのカオリナイトの外部平坦面に架橋し、吸着していた (Poly *et al.*, 2000)。一方、線状 DNA の場合は、鉱物の縁辺末端部位と外部平坦面に吸着していた (参照：図 2 (b), (c))。

Na^+ あるいは Ca^{2+} , Mg^{2+} のいずれかで飽和させたモンモリロナイトとカオリナイトに線状 DNA を吸着させ、透過型電子顕微鏡 (TEM) と走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察すると、線状 DNA のいくらかは外部平坦面にも結合していたが、大部分はその一端が縁辺末端部位に結合し、もう一端は外側に伸びていた (Khanna *et al.*, 1998)。上述したように、モンモリロナイトの方がカオリナイトよりも DNA を多く吸着するが、その親和性はカオリナイトの方が高いことが知られている (Franchi *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2006b)。これは、カオリナイトでは縁辺末端部位が表面積の最大 20% を占めるが、モンモリロナイトでは 1% しか占めないことが原因である (Theng and Orchard, 1995)。すなわち、カオリナイトでは、図 2 (b) に示すように DNA との結合が強い縁辺末端部位での吸着が多いが、モンモリロナイトでは、図 2 (c) のような弱い結合である外部平坦面での吸着が多いことによるだろう (Nielsen *et al.*, 2006)。Franchi *et al.* (1999) は、カオリナイトで、縁辺末端部位と基底表面の両者における正電荷の Al (III) と DNA とが水素結合しているのに対し、モンモリロナイトはより負に荷電し、水和しているため、表面に吸着した陽イオンや水分子と DNA とが相互作用することにより、外部平坦面において DNA が多くの部位で弱く結合していると推定している。

4) モンモリロナイトとカオリナイトとの違い

粘土鉱物のなかで、モンモリロナイトとカオリナイトへの DNA 吸着についての研究例が圧倒的に多い。両鉱物とも層状ケイ酸塩鉱物で、モンモリロナイトは 2:1 型鉱物で層間隔が広がる膨張型、カオリナイトは 1:1 型鉱物で非膨張型である。DNA 吸着量がカオリナイトよりモンモリロナイトで大きいのは、モンモリロナイトの比表面積が大きく、陽イオン交換容量が高いためとされている (Franchi *et al.*, 2003)。しかし、粘土鉱物の DNA 吸着量の推定に、比表面積や陽イオン交換容量を用いるには注意が必要である。イライトは、モンモリロナイトよりも比表面積と陽イオン交換容量が低いにも関わらず、モンモリロナイトよりも多くの DNA を吸着する (Poly *et al.*, 2000)。この実験条件では、DNA 分子が比表面積測定用分子より大きいいため、DNA 分子がイライトとモンモリロナイトの層間に侵入できなかったことが原因であるのかもしれない。もし両粘土鉱物の層間に DNA が侵入しなければ、積層数が多いモンモリロナイトで、比表面積から DNA 吸着部位数を推定すると、過大評価することになる。

5) RNA との比較

Greaves and Wilson (1969) の研究では、DNA と RNA は、

pH 5 以下ではモンモリロナイトの主に層間に吸着し、その吸着量は pH が低いほど多かったが、pH 5 以上では外部平坦面にだけ吸着し、吸着量は少なかった。モンモリロナイトの層間に侵入した DNA と RNA は、外部平坦面に吸着したものよりも難分解であった（ただし、層間に侵入した DNA と RNA も徐々に分解し、時間とともに層間スペースは小さくなった）(Greaves and Wilson, 1970)。DNA と RNA は似通った吸着様式を示したが、RNA の方が DNA よりも、高濃度のときに層間に侵入しやすかった。これは、用いた RNA の分子量が DNA よりも小さかったことと、RNA は一本鎖として存在するため構造がより柔軟であることが原因であると推察された (Greaves and Wilson, 1969)。RNA も DNA と同様、pH が低いほど粘土鉱物に多く吸着した (Goring and Bartholomew, 1952)。RNA 吸着量は、ベントナイト>イライト>カオリナイトの順になり、RNA がベントナイトの層間に侵入することが示唆された (Goring and Bartholomew, 1952)。

6) 溶液条件 (pH, 共存イオン) の影響

Cai *et al.* (2006) は、モンモリロナイト、カオリナイト、ゲータイトへのサケ精子 DNA の吸着量を pH 3 ~ 9 で調べたところ、pH 3 付近で最大吸着することをみつけた。かれらは、この pH 域で DNA が変性し、粘土の表面で凝集や沈殿している可能性を指摘した。今後検討する必要があるだろう。

また Na^+ や K^+ よりも、 Ca^{2+} や Mg^{2+} の存在下で DNA は粘土鉱物に多く吸着した (Goring and Bartholomew, 1952)。 MgCl_2 濃度が低く pH が高い時は主に脱水和により DNA は吸着し、 MgCl_2 濃度が高く pH が低い時は、DNA は静電的に鉱物に引き寄せられていると推測している (Cai *et al.*, 2006c)。モンモリロナイトへの DNA 吸着量は、 Mg^{2+} よりも Ca^{2+} 存在下で高い値を示した (Paget *et al.*, 1992)。また、 Zn^{2+} や Cu^{2+} 存在下では、DNA 吸着量と pH との関係が、 Mg^{2+} や Ca^{2+} の場合とは異なることが予想された (Lawless *et al.*, 1985)。

3. モンモリロナイトとカオリナイト以外の鉱物への DNA 分子の吸着

モンモリロナイトやカオリナイト以外の鉱物への DNA 吸着の研究も報告されている。これら鉱物への DNA 吸着特性は、モンモリロナイトやカオリナイトの場合と共通点も多いが、異なる点も観察された。

1) モンモリロナイト-ヒドロキシアルミニウム複合体

モンモリロナイトとヒドロキシアルミニウムとの複合体 ($\text{Al}(\text{OH})_x\text{-M}$) への DNA 吸着を調べたところ、モンモリロナイトより $\text{Al}(\text{OH})_x\text{-M}$ への DNA 吸着量は低かったが、親和性は高かった (Cai *et al.*, 2008)。また、かれらは、吸着エンタルピーの測定等から、DNA は $\text{Al}(\text{OH})_x\text{-M}$ に配位子結合のような強い結合をすると予想している。

2) ゲータイト

モンモリロナイトとカオリナイト、ゲータイトへのサケ精子 DNA の吸着量が pH 3 ~ 9 で調べられた (Cai *et al.*,

2006c)。Saeki *et al.* (in submitting) は、アロフェンへの DNA 吸着の研究で、比較のために pH 7.0 でのゲータイトへの吸着を報告している。比表面積が相対的に小さいにもかかわらず、アロフェンよりもゲータイトへの DNA 吸着量は大きかった。表面電荷特性 (pzc) から pH 7.0 では、ゲータイトよりアロフェン表面がより負電荷が強くなっていることから、DNA 吸着量が大きくなったと考えられる。

3) シリカ

シリカへの DNA 吸着には、静電斥力の遮蔽・脱水和・水素結合の3つの力が関与している (Melzak *et al.*, 1996)。pH 6 と pH 8 では、DNA とシリカは共に負に荷電しており、静電斥力が作用するが、 Na^+ のような1価陽イオンがあると、DNA のリン酸骨格 (phosphate backbone) 上の負電荷が遮蔽され、両者間の静電斥力が減少し、DNA はシリカに吸着しやすくなる (Nguyen and Elimelech, 2007a)。また Ca^{2+} のような2価陽イオンは、DNA のリン酸骨格に化学的に結合し、効率的にその負電荷を打ち消す。 Ca^{2+} はシリカのシラノール基にも結合し、シリカ表面の負電荷を低下させ、DNA がシリカへ吸着しやすくなる。さらに2価陽イオンにより、DNA はよりコンパクトな構造をとって拡散しやすくなり、DNA が吸着しやすくなる (Nguyen and Elimelech, 2007a)。

4) アロフェン

土壌から精製したアロフェンを用いて、アデニン、リボース、両者が結合したアデノシン、アデノシン-5'-リン酸の吸着が、pH 4, 6, 8 において調べられた (Hashizume and Theng, 2007)。アデニン、リボース、アデノシンは pH 4 より高 pH 域で吸着量が多かった。これはおそらく、溶質とアロフェン双方の pH 依存性電荷特性に由来する静電的引力が pH 上昇とともに増加したためと予想された。アデノシンへリン酸が結合したアデノシン-リン酸 (5'-AMP) では、低 pH 域で多く吸着し、またその吸着量はアデノシンよりも桁違いに多かった。これは、5'-AMP のリン酸基が、アロフェンの孔隙部位の OH 基と配位子交換反応により結合していることによるのだろう (Hashizume and Theng, 2007)。

Saeki *et al.* (in submitting) は、黒ボク土への DNA 吸着機構を理解するために、黒ボク土壌の主要構成粘土鉱物であるアロフェン (天然と合成アロフェン) への DNA 吸着を、反応溶液の DNA 濃度、イオン強度、pH、リン酸イオンとの競合、の観点から調べた。DNA 吸着量と平衡濃度との関係は、Langmuir 式に有意に当てはまった。DNA 分子とアロフェン粒子との間で強い吸着相互作用が働いて、DNA 分子がアロフェン粒子表面で単分子層になっている可能性が考えられた。pH が高くなるほど吸着される DNA 量が減少し、DNA 吸着は溶液 pH によって大きく影響されることがわかった。リン酸イオンをアロフェンに添加することにより吸着 DNA 量は減少し、リン酸と DNA との間で吸着反応における競合が生じることが示され、アロフェンへの DNA 吸着には DNA のリン酸基が関与する可能性を示唆した。これらの結果より、黒ボク土の構成成

分の中で、主要粘土鉱物であるアロフェンがDNA吸着に対して大きな役割を示している媒体の1つであることがわかった。アロフェンは、直径3.5～5 nmの中空球状の構造をしており、多くの場合、凝集体を形成している。内側のSiO₂層と外側のAl₂O₃・nH₂O層で構成され、直径0.3 nmの孔隙が存在している。2本鎖DNA分子の直径は2 nmであるため、理論上、DNA分子は孔隙内部に進入できない。シリカへのDNA吸着はギブサイトに比べてかなり小さいため、DNA分子吸着へのアロフェン粒子内部のSiOH基の寄与は小さいと予想できた。

5) 砂

砂へのDNA吸着では、Na⁺存在下ではpHが低いほうが多く吸着したが、Mg²⁺存在下では酸性側とアルカリ性側の両方でDNAが多く吸着し、中性付近で低くなることが報告されている(Lorenz and Wackernagel, 1987)。アルカリ性側で高い吸着を示した理由は不明である。

6) 雲母

雲母の場合では、イオン半径が0.069～0.074 nmのNi²⁺やCo²⁺、Zn²⁺が存在するとDNAは強く吸着したが、イオン半径がそれらよりも大きいCa²⁺やCd²⁺、Hg²⁺が存在しても吸着しなかった(Hansma and Laney, 1996)。おそらく、雲母の外部平坦面の孔隙(di-trigonal cavity:六角形の断面を持つ孔隙)に陽イオンが入り込むことにより、DNAは雲母に吸着できる。そのため、この孔隙に入り込めないサイズの陽イオンが存在しても、DNAは雲母に吸着できないと推察された。しかし、Mg²⁺はイオン半径が小さいにも関わらず、Mg²⁺存在下ではDNAは雲母に弱くしか吸着できなかった(Hansma and Laney, 1996)。

7) 各種鉱物のDNA吸着性の序列

合成したアロフェンとゲータイト、市販のモンモリロナイト、シリカ、カオリン、ギブサイトへのDNA分子の吸着をほぼ同じ条件(同一のpHとイオン強度)で比較した(Saeki *et al.*, in submitting)(表1)。DNA分子の吸着量は次の順で下がった:ゲータイト>ギブサイト>カオリナイト>アロフェン>シリカ>モンモリロナイト。各鉱物が持つ比表面積(N₂-BET法)は、アロフェン:300 m²g⁻¹(Saeki *et al.* in submitting)、ゲータイト:131 m²g⁻¹、ギブサイト:5.0 m²g⁻¹(Saeki and Matsumoto, 1994)であり、DNA吸着量と比表面積とは直接的な比例関係を示さないと考えられた。

8) 測定上の問題点

これまでに報告された粘土鉱物へのDNA吸着実験の大部分では、DNA吸着量の推定は、粘土鉱物を遠心で沈殿させた後の上清中DNA濃度を260 nmの吸光度で測定することにより行われている。しかし、モンモリロナイトのようにFe³⁺を含む粘土鉱物は、260 nmの波長で吸光し、かつ40,000 x gで遠心分離しても完全には沈殿しないことが示された(Beall *et al.*, 2009)。例えばCaモンモリロナイトの場合、40,000 x gで40分間遠心後に当初の粘土量の2.6%が上清に存在し、二本鎖DNAとして9.5 µg/mLに相当する260 nmでの吸光度を示した。つまり、これまでの多くの研究では、粘土へのDNA吸着量を過小評価している可能性が指摘された。今後、この点について留意し、研究を行う必要がある。

4. 腐植物質へのDNA分子の吸着

腐植物質は、土壌、特に黒ボク土に多く存在し、土壌中のDNA吸着や残存性に対して、その影響を無視することはできない。Stotzky(2000)は、DNAが腐植酸に結合できると言及している。イタリアのAndosol(黒ボク土)から分離・精製した腐植酸を用いた研究では、Na⁺存在下で腐植酸にDNAは吸着し、その70～80%は0.1M NaClやDNA用緩衝液(10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 4 mM NaCl)によって脱着せず、強く結合していることが示唆された(Crecchio and Stotzky, 1998)。また1 mLのDNA用緩衝液の系で行ったDNA吸着実験において、DNA量を一定(50 µg)にして腐植酸の量を増やすと吸着DNA量も増加し、pH 3では腐植酸が2 mgで、pH 4では腐植酸が3 mgで吸着DNA量はほぼ一定になった。しかし、腐植酸量を一定(2 mg)にしてDNA量を最大300 µgまで増やしても、吸着量は増加し続け一定にならなかった(Crecchio and Stotzky, 1998)。彼等の論文では、吸着様式の詳細は明らかになっていない。これらの結果を見ると、DNAが腐植酸表面で凝集沈殿している可能性が考えられる。またPietramellara *et al.*(2009)は、明確な証拠はないが、pH 5以下でDNA構造の変化により、DNAが腐植物質へ疎水結合している可能性を指摘している。さらに、粘土鉱物の場合と同様、図2(c)のように、腐植物質とDNAという両負電荷物質間を陽イオンが架橋して結合させることが想定されている。

表1 各種鉱物に対するDNA吸着 (Saeki *et al.*, in submitting)

	DNA 吸着 平均 (%)	SD		pH	イオン強度 (mol L ⁻¹)
合成アロフェン	30.5	1.4	n = 3	6.8	0.14 ~ 0.18
天然アロフェン	49.5	2.9	n = 3	6.8 ~ 7.0	0.17 ~ 0.18
モンモリロナイト	6.1	2.2	n = 3	6.9	0.16 ~ 0.18
カオリナイト	36.7	4.1	n = 3	6.8	0.16 ~ 0.17
シリカ	16.8	2.1	n = 4	6.7 ~ 7.1	0.16 ~ 0.17
ゲータイト	86.1	1.9	n = 4	6.9	0.17 ~ 0.18
ギブサイト	54.0	3.1	n = 3	6.9	0.17 ~ 0.18

鉱物量: 10 mg, 溶液量: 1.0 mL, 初期 DNA 濃度: 100 µg mL⁻¹
バックグラウンド塩: 0.1 M NaCl, 反応時間: 2 時間

(Levy-Booth *et al.*, 2007)。腐植物質への DNA 吸着のメカニズムについては不明な点が多く、今後さらなる研究が必要である (Pietramellara *et al.*, 2009)。

Saeki and Sakai (2009) は、黒ボク土への DNA 吸着に対する土壌中有機物の影響を、土壌に過酸化水素処理、有機資材 (家畜糞尿スラリー) の施用、673 K 加熱処理を行い、土壌中有機物含量を変化させることによって検証した。土壌全有機物量が増加したスラリー施用土壌の方が、未施用土壌よりもはるかに DNA 吸着量が少なかった。スラリー施用による有機物増加が DNA 吸着に負の影響を与えていることが明らかになった。H₂O₂ 処理土壌は、比表面積が未処理土壌にくらべて約 2 分の 1 に減少したにもかかわらず、未処理土壌よりも DNA 吸着量が高かった。673 K 加熱処理土壌の比表面積は、未処理土壌よりも 3 分の 1 以下に減少したが、その DNA 最大吸着量は未処理土壌よりもはるかに大きかった。これらの結果から、アロフェンや鉄・アルミニウム酸化物に比べ、土壌有機物が土壌への DNA 吸着において示すプラスの影響は小さいことが示唆された。

5. 有機無機複合体への DNA 分子の吸着

ほとんどの DNA 吸着実験では、合成あるいは精製した鉱物を使用している。実際の土壌中では鉱物が単独で存在していることは殆どなく、大部分は他の物質、特に腐植物質に覆われて存在していると想像される。そのため、土壌中での DNA 残存性の解明には、有機無機複合体への DNA 吸着を理解する必要がある。有機無機複合体への DNA 吸着に関する研究例は、純粋な鉱物を用いた場合と比べてきわめて少ない。

Nguyen and Elimelech (2007b) は、有機物に覆われたシリカへの DNA 吸着を Na⁺ 存在下で調査した。Na⁺ が高濃度の時に線状 DNA と超らせん構造 DNA は同様な吸着速度を示し、両者とも有機物に覆われたシリカによく吸着したが、線状 DNA の方が厚い吸着層を形成した。Na⁺ が低濃度の時には、線状 DNA がよく吸着した。これは、線状 DNA は静電斥力で伸長し、その末端が、シリカを覆った有機物に吸着しやすいと推測された (Nguyen and Elimelech, 2007b)。2 種の DNA の吸着量は、Mg²⁺ よりも Ca²⁺ 存在下で多かった (Nguyen and Chen, 2007)。Ca²⁺ は、アルカリ土類金属の中で DNA のリン酸基と内圏錯体を形成する唯一の元素であり、また有機物のカルボキシル基とも内圏錯体を形成できるため、DNA のリン酸基と有機物のカルボキシル基を Ca²⁺ が架橋している可能性が考えられた。一方 Mg²⁺ は、DNA のリン酸基と有機物のカルボキシル基の両方と内圏錯体を形成できないため架橋せず、両者の負電荷を打ち消すだけであろう。

イタリアの森林植生下の黒ボク土から精製した腐植酸と、モンモリロナイト、アルミニウムあるいは鉄のヒドロキシポリマーとの 3 成分からなる複合体 (それぞれ Al-M-HA と Fe-M-HA と略記) へ DNA を吸着させた実験では、Al-M-HA あるいは Fe-M-HA のいずれも、その組成や調製

方法によって、DNA 吸着が Langmuir や Freundlich 吸着等温式に適合する場合と、適合しない場合がみられ、異なった吸着機構の存在が示唆された (Crecchio *et al.*, 2005)。Al-M-HA と Fe-M-HA 複合体中の有機物量が多くなると、DNA 吸着量は低下した。また両複合体とも、pH が低いほど DNA 吸着量が高くなる傾向が見られた。Fe-M-HA と Al-M-HA に吸着した DNA は、蒸留水、0.1 M NaCl、0.1 M Na₄P₂O₇ によって僅か 1% しか抽出されず、強く吸着していた (Crecchio *et al.*, 2005)。

6. 土壌への DNA 分子の吸着

土壌への DNA 吸着量は、粘土含量や種類・土壌溶液中の成分・有機炭素量によって影響される (Wackernagel, 2006)。とくに粘土含量は、土壌の DNA 吸着容量に大きな影響を与える (Levy-Booth *et al.*, 2007)。しかし上述したとおり、粘土の種類によって DNA 吸着容量は異なり、特にモンモリロナイト含量が重要なことが指摘されている (Cai *et al.*, 2005)。また、日本の黒ボク土ではアロフェンやイモゴライト、鉄、アルミニウム酸化物含量が土壌の DNA 吸着容量に重要な影響を与えることが示された (Saeki *et al.*, 2008)。加えて、黒ボク土が、灰色低地土や赤黄色土に比べて約 2 倍 DNA を多く吸着することが確認された (Saeki *et al.*, 2008)。

1) pH の影響

Saeki *et al.* (2010) は、黒ボク土への DNA 吸着に対する pH の影響を調べた。pH が高くなるほど吸着された DNA 量が減少し、上記した鉱物等の場合と同様に、DNA 吸着は溶液 pH によって大きく影響されることがわかった。DNA の土壌への吸着メカニズムは、粘土鉱物の場合と同様、pH によって異なる (Levy-Booth *et al.*, 2007)。土壌粒子への DNA 吸着機構は pH 依存的で、DNA の等電点 (約 pH 5.0) より pH が低い場合は DNA は正に荷電し、負電荷の粘土等の土壌粒子に吸着しやすくなるが、pH 5 以上では負電荷の土壌粒子とは斥力が働く (Stotzky, 2000)。別の言い方をすると、pH 5 以上では、土壌成分も DNA も正味では負に荷電しているため、陽イオンの存在によって吸着が促進される。一方 pH 5 以下では、DNA は正電荷を示し、陽イオンの存在に関係なく、土壌に吸着することが予想される (Levy-Booth *et al.*, 2007)。

2) 陽イオン・イオン強度の影響

Saeki *et al.* (2010) は、黒ボク土への DNA 吸着に対するイオン強度の影響を調べた。バックグラウンド塩として NaCl を用いた場合、調査したイオン濃度範囲 (0.1 ~ 0.5 mol L⁻¹) では、pH 一定 (6.8 ~ 7.0) の条件で、黒ボク土への DNA 吸着割合は一定であり、この条件では、DNA 吸着はイオン強度に影響されないと判断できた。

pH 5 以上では、陽イオンが共存すると DNA は土壌粒子によく吸着する。また 2 価陽イオンの方が 1 価陽イオンよりもその効果は大で、1 価陽イオン濃度の約 100 分の 1 の 2 価陽イオンで同等の DNA 吸着量を示す (Levy-Booth *et al.*, 2007)。土壌粒子への DNA 吸着は、環境中に存在する

レベルの2価陽イオンで促進されており (Romanowski *et al.*, 1991), 実際の土壌中でも2価陽イオンの役割は大きいと考えられる。

なお, 共存する塩やpHによってDNA吸着量は大きく変動するので, これまでに報告されたDNA吸着データを比較する場合には, 使用された緩衝液の成分等の実験条件について注意を払う必要がある。

3) 孔隙・水分の影響

土壌中では, 分子量がより小さいDNAほど孔隙内に拡散・侵入しやすいため, より多く吸着する (Ogram *et al.*, 1994)。しかしマイクロ孔隙のない砂では, 分子量の大きいDNAが多く吸着することが報告されている (Ogram *et al.*, 1988, 1994)。マイクロ団粒内やマイクロ孔隙内にDNAが存在すると, 酵素分解を受けにくく長期間残存できる (Nielsen *et al.*, 2006)。また, 土壌が乾燥するとDNAはB型からZ型に構造変化し, 難分解性になり形質転換能が小さくなると予想されている (Nielsen *et al.*, 2006)。

通常, 細胞外に放出されたDNAは, 拡散等によりごく近傍までしか移動できないと考えられている。しかし, 毛管作用による水の垂直移動にともない, 土壌に緩く吸着していたDNAが脱着して移動することが示唆された (Ceccherini *et al.*, 2007)。この実験では, 土壌カラムの底に添加したDNAは水の動きにともない上方へ移動し, 1時間後には底から7.5 cmの位置からDNAが検出された。さらに12時間後に滅菌水のみを土壌カラムの底に添加すると, 1日後にはカラムの最上部 (10 cmの高さ) でDNAが検出されている。野外では, 実験室で予想される以上に, 水の動きによってDNAが移動する可能性がある。

4) 土壌から調製した粘土画分へのDNA分子の吸着

Caiらのグループ (Cai *et al.*, 2006a) は, 中国の2種類の土壌 (アルフィソル (Alfisol) とアルティソル (Ultisol)) から有機質粗粘土・無機質粗粘土・有機質細粘土・無機質細粘土を調製し, DNA吸着を調べた。サケ精子DNAは, 粗粘土 (0.2~2 μm) より細粘土 (<0.2 μm) に多く吸着したが, 親和性は粗粘土で高かった。またアルティソルのコロイドが, アルフィソルのコロイドよりDNAへの親和性が高かった。アルフィソルから調製した各種粘土画分へのサケ精子DNAの吸着量が, モンモリロナイトやカオリナイトの場合と比較された: モンモリロナイト>無機質細粘土>有機質細粘土>カオリナイト>無機質粗粘土>有機質粗粘土の順で吸着量が下がった (Cai *et al.*, 2006b)。またLangmuir吸着等温式から推定した親和性は, 無機質粗粘土>カオリナイト>無機質細粘土>有機質粗粘土>有機質細粘土・モンモリロナイトの順であった。この順は, 10 mM Tris (pH 7.0) と100 mM NaCl, 100 mM リン酸 (pH 7.0) による逐次抽出の結果から推定された, DNAへの親和性の順 (カオリナイト>無機質粗粘土>無機質細粘土>有機質粗粘土>モンモリロナイト>有機質細粘土) と概ね一致した。細粘土の高いDNA吸着量は, 2:1型の層状ケイ酸塩が細粘土画分に多く含まれるためであり, 粗粘土のDNAへの高い親和性は, 粗粘土画分にカオリナイトが

多く含まれることによると推察している。

植物根からの分泌物がDNA吸着に与える影響についても調べられている。ゲータイトやモンモリロナイト・カオリナイト・アルフィソルから分離した有機質粘土と無機質粘土へのサケ精子DNAの吸着は, クエン酸や酒石酸の存在によって低下した (Cai *et al.*, 2007)。その阻害は, 無機質粘土よりも有機質粘土で顕著であった。しかしモンモリロナイトとカオリナイトの場合には, 5 mM以上の濃度の有機酸はDNA吸着量を増加させた。根圏のような局所的に有機酸濃度が高い微小空間では, モンモリロナイトとカオリナイトは, ゲータイトや無機質粘土, 有機質粘土とは異なりDNA吸着に重要な役割を果たすと考えられる。

有機物を減少させた土壌をさらに酸性シュウ酸塩を用いて, 鉄, アルミ酸化物やアロフェンなどを減少させた場合, DNA吸着量は本来の土壌の酸化物量に対応して減少した (Saeki *et al.*, 2008)。土壌構成成分の中でも, 非晶質鉱物であるアロフェンや酸化物がDNA吸着への影響が大きいと考えられる。よって, 土壌中のこれらの酸化物がDNA吸着の主要な媒体であることが示唆された。

7. 結 論

黒ボク土とアロフェンともに, DNA吸着量と平衡濃度との関係はLangmuir式に有意に当てはまった。この吸着等温線は, L型またはH型であった (Saeki *et al.*, 2008, in submitting)。DNA分子と土壌粒子との間で強い吸着相互作用が働いて, DNA分子が土壌粒子表面で単分子層になっていると考えられた。

現在, DNA分子の土壌粒子に対する2つの吸着形態が想定されている。1つ目は, 図2(a), (b)で示した土壌粒子へのDNA吸着反応で, DNA分子末端のリン酸基が土壌粒子外表面の酸化物のOH基に結合する機構である。同様に, モンモリロナイトなどの層状ケイ酸塩鉱物の結晶末端のAl酸化物のOH基へもDNA分子は吸着するだろう。高pH域では吸着DNA量は減少する。pHが高くなると, 変異荷電粘土の土壌は表面のAlOHが脱プロトン化され, AlO^- が増加し, DNAのリン酸基と反発し近づけないため, DNAが吸着されにくいと考えられる。土壌のAlOHとDNAのリン酸基が配位子交換反応で吸着結合しているかどうかは, 現在のところ, 判明していない。

2つ目は, 図2(c)に示した, 陽イオンが架橋として使用される土壌粒子外表面での吸着形態である。pH 8~9で, 土壌に対するDNAの吸着は0%にならず, 加えて, リン酸イオンによって, DNAの吸着がすべて阻害されるわけではなかった (Saeki *et al.*, 2010)。また吸着量は小さいが, DNA分子は, 中性からアルカリ性では全体として負に帯電しているシリカ表面にも吸着された (Saeki *et al.*, in submitting)。これらの結果は, 無機陰イオンの吸着反応で見られる粒子表面の正荷電量とOH基量と, DNA分子末端のリン酸基との反応だけでは説明できない。陽イオンを架橋として使用する層状ケイ酸塩鉱物などへの吸着形態がKhanna and Stotzky (1992) とPaget *et al.* (1992) に

よって提案されている。また Ca^{2+} はシリカなどの鉱物のシラノール基にも結合し、鉱物表面の負電荷を低下させ、DNA が吸着しやすくなる (Nguyen and Elimelech, 2007a)。この吸着機構は高 pH 域での DNA 吸着にも、配位子交換反応をとともなう吸着を補填する反応として当てはまるかもしれない。もしこの反応が大きく寄与しているのであれば、溶液中の陽イオン量 (イオン強度) を上げることで DNA 吸着量は増加するはずである。実際、シリカでは、イオン強度 ($\sim 4 \text{ mol L}^{-1}$) 増加で DNA 吸着量は増加した (Lorenz and Wackernagel, 1987)。この吸着反応に対しては、 Na^+ より Mg^{2+} の能力が高い (Levy-Booth *et al.*, 2007)。加えて、 Ca^{2+} のような 2 価陽イオンは、DNA のリン酸骨格に化学的に結合し、効率的にその負電荷を打ち消す。さらに 2 価陽イオンにより、DNA はよりコンパクトな構造をとって拡散しやすくなり、DNA が吸着しやすくなる (Nguyen and Elimelech, 2007a)。

土壌の DNA 吸着能力は、粘土含量、酸化物含量に左右されることは予測の範囲内であるが、交換性陽イオンまたは土壌溶液中陽イオンのイオン組成によっても影響を受けるかもしれない。

「土壌、特に黒ボク土の構成成分の中で、何が DNA 分子を吸着するのか?」という問いに対して、当初、主要な吸着サイトは無機鉱物であり、腐植物質は DNA を吸着しないであろうと著者たちは思い込んでいた。DNA 吸着反応で、DNA 分子末端のリン酸基が鉱物表面の OH 基に結合する機構を想定していたため、黒ボク土から有機物を削減処理すると、DNA 吸着量が増加したためである (Saeki and Sakai, 2009)。しかし、他の研究とこれまでの著者たちの研究とを総合すれば、鉱物が DNA 分子の主要な吸着サイトであることはもちろんであるが、腐植物質も DNA 吸着サイトとして十分に働いていると結論づけられる。酸性領域以外で、腐植物質は全体として負に帯電しているため、腐植物質への DNA 吸着のメカニズムは、図 2 (c) に示した、陽イオンを架橋として使用する負電荷粒子表面上での吸着形態が重要であろう。

謝 辞

本研究は科研費 (基盤 (B) No.19380044, No.22380180) の助成を受けたものである。

引用文献

- 1) Beall GW, Sowersby DS, Roberts RD, Robson MH and Lewis LK (2009) Analysis of oligonucleotide DNA binding and sedimentation properties of montmorillonite clay using ultraviolet light spectroscopy. *Biomacromolecules*, **10**, 105-112
- 2) Cai P, Huang Q, Zhang X and Chen H (2005) Binding and transformation of extracellular DNA in soil. *Pedosphere*, **15**, 16-23
- 3) Cai P, Huang Q, Jiang D, Rong X and Liang W (2006a) Microcalorimetric studies on the adsorption of DNA by soil colloidal particles. *Colloid Surf. B*, **49**, 49-54
- 4) Cai P, Huang Q, Zhang X and Chen H (2006b) Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol. *Soil Biol. Biochem.*, **38**, 471-476
- 5) Cai P, Huang Q and Zhang X (2006c) Microcalorimetric studies of the effects of MgCl_2 concentrations and pH on the adsorption of DNA on montmorillonite, kaolinite and goethite. *Appl. Clay Sci.*, **32**, 147-152
- 6) Cai P, Huang Q, Zhu J, Jiang D, Zhou X, Rong X and Liang W (2007) Effects of low-molecular-weight organic ligands and phosphate on DNA adsorption by soil colloids and minerals. *Colloid Surf. B*, **54**, 53-59
- 7) Cai P, Huang Q, Li M and Liang W (2008) Binding and degradation of DNA on montmorillonite coated by hydroxyl aluminum species. *Colloid Surf. B*, **62**, 299-306
- 8) Ceccherini MT, Ascher J, Pietramellara G, Vogel TM and Nannipieri P (2007) Vertical advection of extracellular DNA by water capillarity in soil columns. *Soil Biol. Biochem.*, **39**, 158-163
- 9) Choy JH, Kwak SY, Park JS, Jeong YJ and Portier J (1999) Intercalative nanohybrids of nucleoside monophosphates and DNA in layered metal hydroxide. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1399-1400
- 10) Crecchio C and Stotzky G (1998) Binding of DNA on humic acids: effect on transformation of *Bacillus subtilis* and resistance to DNase. *Soil Biol. Biochem.*, **30**, 1061-1067
- 11) Crecchio C, Ruggiero P, Curci M, Colombo C, Palumbo G and Stotzky G (2005) Binding of DNA from *Bacillus subtilis* on montmorillonite-humic acids-aluminum of iron hydroxypolymers: effects on transformation and protection against DNase. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **69**, 834-841
- 12) Franchi M and Gallori E (2004) Origin, persistence and biological activity of genetic material in prebiotic habitats. *Orig. Life Evol. Biosph.*, **34**, 133-141
- 13) Franchi M, Bramanti E, Bonzi LM, Orioli PL, Vettori C and Gallori E (1999) Clay-nucleic acid complexes: characteristics and implications for the preservation of genetic material in primeval habitats. *Orig. Life Evol. Biosph.*, **29**, 297-315
- 14) Franchi M, Ferris JP and Gallori E (2003) Cations as mediators of the adsorption of nucleic acids on clay surfaces in prebiotic environments. *Orig. Life Evol. Biosph.*, **33**, 1-16
- 15) Gallori E, Bazzicalupo M, Dal Canto L, Fani R, Nannipieri P, Vettori C and Stotzky G (1994) Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **15**, 119-126
- 16) Goring CAI and Bartholomew WV (1952) Adsorption of mononucleotides, nucleic acids, and nucleoproteins by clays. *Soil Sci.*, **74**, 149-164
- 17) Greaves MP and Wilson MJ (1969) The adsorption of nucleic acids by montmorillonite. *Soil Biol. Biochem.*, **1**, 317-323
- 18) Greaves MP and Wilson MJ (1970) The degradation of nucleic acids and montmorillonite-nucleic-acid complexes by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, **2**, 257-268

- 19) Hansma HG and Laney DE (1996) DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, **70**, 1933-1939
- 20) Hashizume H and Theng BKG (2007) Adenine, adenosine, ribose and 5'-AMP adsorption to allophane. *Clays Clay Miner.*, **55**, 599-605
- 21) Hazen RM (2001) 深海底の鉱物が育んだ生命, 日経サイエンス, **31**, 32-42
- 22) Hoffman A, Thimm T, Droge M, Moore ERB, Munch JC and Tebbe CC (1998) Intergeneric transfer of conjugative and mobilizable plasmids harbored by *Escherichia coli* in the gut of the soil microarthropod *Folsomia candida* (collembola). *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2652-2659
- 23) 星野 (高田) 裕子・長谷部亮 (2005) 土壌からの DNA 抽出法, 環境バイオテクノロジー学会誌, **5**, 43-53
- 24) Khanna M and Stotzky G (1992) Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1930-1939
- 25) Khanna M, Yoder M, Calamai L and Stotzky G (1998) X-ray diffractometry and electron microscopy of DNA from *Bacillus subtilis* bound on clay minerals. *Sci. Soils*, **3**, 1-10
- 26) Lawless JG, Banin A, Church FM, Mazzurco J, Huff R, Kao J, Cook A, Lowe T, Orenberg JB and Edelson E (1985) pH profile of the adsorption of nucleotides onto montmorillonite. I. Selected homoionic clays. *Orig. Life*, **15**, 77-88
- 27) Levy-Booth DJ, Campbell RG, Gulden RH, Hart MM, Powell JR, Klironomos JN, Pauls KP, Swanton CJ, Trevors JT and Dunfield KE (2007) Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biol. Biochem.*, **39**, 2977-2991
- 28) Lorenz MG and Wackernagel W (1987) Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2948-2952
- 29) Lorenz MG and Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.*, **58**, 563-602
- 30) Melzak KA, Sherwood CS, Turner RFB and Haynes CA (1996) Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *J. Colloid Interface Sci.*, **181**, 635-644
- 31) Nguyen TH and Chen KL (2007) Role of divalent cations in plasmid DNA adsorption to natural organic matter-coated silica surface. *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 5370-5375
- 32) Nguyen TH and Elimelech M (2007a) Plasmid DNA adsorption on silica : kinetics and conformational changes in monovalent and divalent salts. *Biomacromolecules*, **8**, 24-32
- 33) Nguyen TH and Elimelech M (2007b) Adsorption of plasmid DNA to a natural organic matter-coated silica surface : kinetics, conformation, and reversibility. *Langmuir*, **23**, 3273-3279
- 34) Nielsen KM, Calamai L and Pietramellara G (2006) Stabilization of extracellular DNA and proteins by transient binding to various soil components. In *Nucleic Acids and Proteins in Soil*, Ed. P Nannipieri and K Smalla, p.141-157, Springer-Verlag, Berlin
- 35) Ogram A, Sayier GS, Gustin D and Lewis RJ (1988) DNA adsorption to soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.*, **22**, 982-984
- 36) Ogram AV, Mathot ML, Harsh JB, Boyle J and Pettigrew CA Jr (1994) Effects of DNA polymer length on its adsorption to soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 393-396
- 37) Paget E and Simonet P (1994) On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **15**, 109-118
- 38) Paget E, Monrozier LJ and Simonet P (1992) Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNaseI and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol. Lett.*, **97**, 31-39
- 39) Pietramellara G, Dal Canto L, Vettori C, Gallori E and Nannipieri P (1997) Effects of air-drying and wetting cycles on the transforming ability of DNA bound on clay minerals. *Soil Biol. Biochem.*, **29**, 55-61
- 40) Pietramellara G, Franchi M, Gallori E and Nannipieri P (2001) Effect of molecular characteristics of DNA on its adsorption and binding on homoionic montmorillonite and kaolinite. *Biol. Fertil. Soils*, **33**, 402-409
- 41) Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F, Ceccherini MT, Guerri G and Nannipieri P (2009) Extracellular DNA in soil and sediment : fate and ecological relevance. *Biol. Fertil. Soils*, **45**, 219-235
- 42) Poly F, Chenu C, Simonet P, Rouiller J and Jocteur Monrozier L (2000) Differences between linear chromosomal and supercoiled plasmid DNA in their mechanisms and extent of adsorption on clay minerals. *Langmuir*, **16**, 1233-1238
- 43) Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG and Triplett EW (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.*, **1**, 283-290
- 44) Romanowski G, Lorenz MG and Wackernagel W (1991) Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1057-1061
- 45) Saeki K and Matsumoto S (1994) Selenite adsorption by a variety of oxide. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **25**, 2147-2158
- 46) Saeki K and Sakai M (2009) The influence of soil organic matter on DNA adsorptions on andosols. *Microbes Environ.*, **24**, 175-179
- 47) Saeki K, Morisaki M and Sakai M (2008) The effects of hydrogen peroxide and acid oxalate treatments on DNA adsorption on soils. *Microbes Environ.*, **23**, 353-355
- 48) Saeki K, Kunito T and Sakai M (2010) Effects of pH, ionic strength and other solutes on DNA adsorption by andosols. *Biol. Fertil. Soils.*, **46**, 531-535
- 49) Saeki K, Sakai M and Wada S-I (in submitting) DNA adsorption on synthetic and natural allophanes. *Appl. Clay Sci.*
- 50) Stotzky G (2000) Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *J. Environ. Qual.*, **29**, 691-705

- 51) Theng BKG and Orchard VA (1995) Interactions of clays with microorganisms and bacterial survival in soil: a physicochemical perspective. *In* Environmental Impact of Soil Component Interactions, Ed. PM Huang, J Berthelin, J-M Bollag, WB McGill and AL Page, p.123-143, CRC Press, Boca Raton, Florida
- 52) Wackernagel W (2006) The various sources and the fate of nucleic acids in soil. *In* Nucleic Acids and Proteins in Soil, Ed. P Nannipieri and K Smalla, p.117-139, Springer-Verlag, Berlin.