

総説

土壌生態系における細胞外 DNA 分子の挙動 第 2 部：細胞外 DNA 分子の安定性と形質転換能

佐伯和利¹・國頭 恭²・境 雅夫^{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

³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

Fate of extracellular DNA molecules in soil eco-system Part 2: Stability and transformation frequency of DNA in soils

Kazutoshi Saeki¹, Takashi Kunito² and Masao Sakai^{3*}

¹ Biotron Institute, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

² Department of Environmental Sciences, Faculty of Science, Shinshu University,
3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan

³ Department of Biochemical Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University,
1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

Key words : competence, DNA transformation, natural transformation, soil

1. はじめに

環境中での遺伝子の水平伝播は、微生物の進化や多様性に関わる重要なプロセスである。遺伝子の水平伝播は、形質転換、接合、形質導入の3つによって行われる (Yin and Stotzky, 1997)。形質転換はさらに、自然形質転換 (natural transformation) と人為的形質転換 (artificial transformation) に分けられる。本稿では、土壌中での自然形質転換を中心に扱う。

1) 土壌中の細胞外 DNA

DNA は微生物が産出するヌクレアーゼによって分解されやすいため、環境中での形質転換は重要なプロセスではないと考えられていた。しかし現在では、本稿で概説するように、DNA は粘土鉱物などに吸着することによって土壌中に長期間残存し、形質転換能を有することが明らかとなっている (図 1)。土壌中で形質転換が起こるには、取り込まれる細胞外 DNA が必要となる。遊離状態の細胞外 DNA は、主に細菌が分泌するヌクレアーゼ (Blum *et al.*, 1997) により短時間で分解される (Levy-Booth *et al.*, 2007)。DNA は土壌粒子に吸着することで難分解化するため、細胞外 DNA は主に土壌粒子表面に存在している (Pietramellara *et al.*, 2006)。土壌中の細胞外 DNA 濃度は 0.03 ~ 200 µg/g 土壌であり (Pietramellara *et al.*, 2009)、土壌中の全 DNA の 10 ~ 60% 程度を占めている (Agnelli *et al.*, 2004)。

細胞外 DNA の大部分は死細胞から放出されたもので

あるが (Levy-Booth *et al.*, 2007)、生細胞から積極的に放出された DNA もある。積極的放出の理由としては、損傷 DNA の排出やバイオフィーム形成への利用など、いくつかの説がある (Pietramellara *et al.*, 2009)。枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は、定常期や死滅期、あるいは低栄養かつ低温状態で多くの DNA を放出する (Wackernagel, 2006)。いくつかのグラム陰性細菌は、DNA を内包した bleb とよばれる膜小胞を放出することが知られている (Wackernagel, 2006)。細胞外 DNA は、微生物へのリンや窒素などの栄

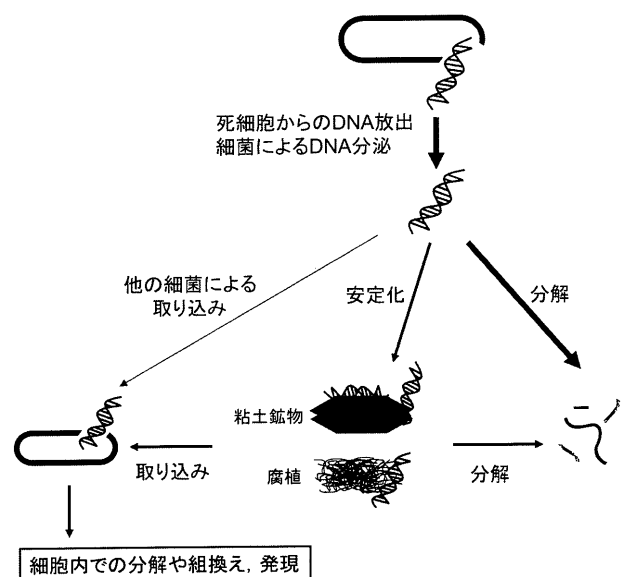


図 1 土壌中での細胞外 DNA の挙動の概念図
矢印の太さは、その頻度を相対的に示している。

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

養源としての役割もある。DNA 中のリンは、土壌中の抽出可能なリンの 10% 以上にもなることが報告されている (Levy-Booth *et al.*, 2007)。海洋底泥では、原核生物が必要とするリンの約 50% は、DNA 分解により供給されている (Dell'Anno and Danovaro, 2005)。

2) 土壌中の細胞外 DNA の挙動

土壌中において、細胞外に放出された DNA は通常すぐに分解されるにも関わらず、一部の DNA は長期間残存する。野外で生育させた植物の DNA 断片は、栽培後すくなくとも数年間は土壌中で検出される (Nielsen *et al.*, 2007)。また約 46 万 5 千年前の堆積層において、その化石だけでなく、当時の脊椎動物の DNA が土壌中に残存していることがサザンハイブリダイゼーションで確認された (Geigl *et al.*, 2004)。1 万年～40 万年前の永久凍土と、温帯の 600 年～3300 年前の堆積物からも、当時の植物や動物の DNA が PCR により増幅された (Willerslev *et al.*, 2003; Haile *et al.*, 2007)。永久凍土の場合は残存していた細胞から DNA が抽出された可能性が高いが、分解が速いことが予想される温帯の堆積物からも古代生物の DNA が抽出されたことから、著者らは DNA が粘土等に吸着することにより細胞外で安定に存在していた可能性を指摘している (Haile *et al.*, 2007)。なお、粘土鉱物に吸着した DNA は、粘土から脱着することなく、DNA ポリメラーゼによって PCR 増幅されることが示されている (Vettori *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, 1998)。細胞外 DNA は微生物分解されなくても酸化等の化学的作用により損傷を受けるため、吸着 DNA の残存期間は 5 万年～100 万年と推定されている (Hebsgaard *et al.*, 2005)。海洋底泥では、細胞外 DNA の化学作用による損傷は、温度・水深・炭素量・塩分・酸化還元電位等に影響されることが報告されている (Corinaldesi *et al.*, 2008)。土壌環境においてはこのような研究例は皆無であり、DNA の残存性に関わる環境因子の調査が必要であろう。また、微生物を含めた古代生物の DNA 研究といった観点からも、土壌中における DNA の長期残存の仕組みに興味を持たれる。

長期間残存した後で他の細胞に形質転換して発現する可能性がある細胞外 DNA は、潜在的遺伝子 (cryptic genes) と称されている (e.g., Crecchio and Stotzky, 1998)。このような細胞外 DNA は、遺伝子改変作物の安全性に関連して注目されている (Nielsen *et al.*, 2007)。微生物間で遺伝子の水平伝播がかなりの頻度で生じてきたこと (Doolittle, 2000) を考慮すると、微生物の進化においても重要な役

割をもっているのかもしれない。

本稿では、細胞外 DNA が土壌中で安定に残存するメカニズムと、その形質転換能について概説する。

2. 土壌中での自然形質転換

自然形質転換能をもつ細菌やアーケアが少なくとも 87 種確認されており、未調査の原核生物の中にも多数存在すると予想されている (de Vries and Wackernagel, 2004)。自然形質転換する細菌の例を表 1 に示す。自然形質転換しないと判断された種でも実際には、コンピテント化する条件が解明されていない場合もある (de Vries and Wackernagel, 2004)。自然形質転換する種の中で *Neisseria gonorrhoeae* のみが構成的なコンピテントを示す (Lorenz and Wackernagel, 1994; Solomon and Grossman, 1996; Thomas and Nielsen, 2005)。他種では、一般に低栄養状態でコンピテント化が誘導されやすい (Stotzky, 1989; Lorenz and Wackernagel, 1994; Yin and Stotzky, 1997)。ただし、グラム陽性や陰性といったグループ間、あるいは種間で、コンピテント化の誘導機構は異なる (Solomon and Grossman, 1996; Pietramellara *et al.*, 2009)。例えば、*Acinetobacter* と *Azotobacter* 属細菌は主に定常期でコンピテントになり、*Streptococcus* や *Bacillus* 属細菌は、培地中での水溶性コンピテンス因子 (受容能開発因子) が閾値以上集積するとコンピテントになる (Paget and Simonet, 1994)。*Haemophilus influenzae* は低栄養でコンピテント化が促進され、逆に *Streptococcus pneumoniae* では低栄養でコンピテント化が抑制される (Solomon and Grossman, 1996)。枯草菌は、アミノ酸がない場合は対数増殖期で、アミノ酸がある場合は定常期でコンピテントになりやすい (Solomon and Grossman, 1996)。

コンピテント細胞への細胞外 DNA の取り込み機構は、十分には解明されていない。細菌表面の細胞外 DNA 結合部位は、一部の細菌でしか調べられていないが、30～80 である (Thomas and Nielsen, 2005)。グラム陽性細菌は、細胞表面に DNA が結合した後 DNA を一本鎖にして細胞膜を通過させ、残りは分解する (Solomon and Grossman, 1996)。グラム陰性細菌では、外膜孔 (セクレチンなど) を二本鎖 DNA で通過させ、その後、細胞膜のところで一本鎖にして細胞に取り込み、残りは分解する (Solomon and Grossman, 1996)。この DNA 取り込みの際、特異的な DNA 配列しか取り込まない種もあるが、大部分の種における DNA の取り込みは非選択的であり、その取り込

表 1 自然形質転換能力を有する細菌の例 (Solomon and Grossman, 1996)

	取り込む DNA 配列	コンピテント化へ与える要因
グラム陽性細菌		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	非特異的	細胞間シグナルで誘導; 定常期で阻害
<i>Bacillus subtilis</i>	非特異的	細胞間シグナルで誘導; 栄養状態による調節
グラム陰性細菌		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	特異的な配列のみ	構成的なコンピテント化
<i>Haemophilus influenzae</i>	特異的な配列のみ	飢餓による誘導; 細胞内の高濃度 cAMP による誘導

み速度は1秒間に60-100 bpである(Thomas and Nielsen, 2005)。

一般に、土壤環境中では (*in situ*), プラスミド DNA の形質転換効率は染色体 DNA よりも低い (Yin and Stotzky, 1997; Thomas and Nielsen, 2005)。これは、*in vitro* の場合と異なり、プラスミド DNA を線状の一本鎖で取り込んだ後、細胞内で再び二本鎖の環状 DNA にするための障壁が大きいことによる。細胞内に DNA が取り込まれた後の詳細は、Lorenz and Wackernagel (1994) と de Vries and Wackernagel (2004) の総説を参照されたい。

3. 土壤粒子に吸着した DNA のヌクレアーゼ耐性

1) 層状ケイ酸塩に吸着した DNA のヌクレアーゼ耐性

DNA はモンモリロナイトに吸着することで、ヌクレアーゼに対して耐性を示した (Gallori *et al.*, 1994)。Stotzky (2000) は、粘土鉱物に吸着した DNA が難分解化する理由として、DNA 構造や電子分布の変化によりヌクレアーゼが DNA を認識できず、切断部位に作用できない可能性を挙げている。実際、DNA の二重らせん構造が吸着によって変化する例が報告されている。シリカに λ -DNA が吸着した場合 (Mao *et al.*, 1994) とサケ精子 DNA がモンモリロナイトに吸着した場合 (Cai *et al.*, 2008) では、DNA は B 型 (溶液中での通常の DNA 構造) のままであったが、モンモリロナイトに枯草菌の染色体 DNA が吸着すると A 型 (B 型より太く短い構造) へ (Franchi *et al.*, 1999; Franchi and Gallori, 2004)、モンモリロナイトとヒドロキシアルミニウムの複合体にサケ精子 DNA が吸着すると左巻きの Z 型 (Cai *et al.*, 2008) になり、ヌクレアーゼによる分解に耐性を示した。この DNA 構造の変化は、粘土鉱物への DNA の強い吸着によって引き起こされたものと考えられる。粘土鉱物に吸着した DNA が、添加したヌクレアーゼに分解されにくいもう1つの理由として、ヌクレアーゼ自体が粘土鉱物に吸着して活性が低下してしまうことも挙げられる。Demanèche *et al.* (2001) によると、イライトに吸着させた DNA は、カオリナイトやモンモリロナイトに吸着させた DNA よりも DNase I により分解されやすかった。この結果は、カオリナイトやモンモリロナイトに吸着させた DNA が DNase I に対して強い分解抵抗性を示すためではなく、DNase I がカオリナイトとモンモリロナイトにより多く吸着することで活性が低下し、DNA が残存しやすいためであることが判明した (Demanèche *et al.*, 2001)。また、砂に吸着した DNA もヌクレアーゼに対して耐性を示したが、超らせん (supercoil) 構造から開環状 (open circular) 構造に変化しており、吸着・残存した DNA もヌクレアーゼにより若干攻撃されることが示された (Romanowski *et al.*, 1991)。線状、開環状、閉環状 (covalently closed circular; 超らせん構造で存在) の3タイプの DNA をモンモリロナイトに吸着させた後に DNase I で処理すると、閉環状 DNA が減少し、線状と開環状 DNA が増加した (Paget *et al.*, 1992)。これはモンモリロナイトに吸着していた閉環状 DNA に DNase I が切れ目を入れて開環状にし、さらに

線状 DNA にしたものと考えられる。

2) 砂に吸着した DNA のヌクレアーゼ耐性

とくに $MgCl_2$ 濃度が低い条件で砂に吸着した DNA が酵素分解されにくいことが報告されている (Lorenz and Wackernagel, 1994)。また、 Mg^{2+} 存在下で砂に吸着させた DNA の 90% は DNase I により数分間で分解されたが、残りの 10% は比較的安定に存在し、安定性の異なる2タイプの吸着 DNA が存在した (Lorenz and Wackernagel, 1987)。著者らはこの理由として、詳細は不明であるとしながらも、砂に少量含まれる重鉱物に吸着した DNA が、砂の大半を占める石英に吸着した DNA よりも難分解性である可能性を指摘している。

3) 腐植酸に吸着した DNA のヌクレアーゼ耐性

腐植酸に吸着した DNA は、ヌクレアーゼ分解に対して抵抗性を示した (Crecchio and Stotzky, 1998)。この難分解化には、DNA 構造の変化が関与しているのかもしれない。Vettori *et al.* (2004) によると、DNA は腐植酸に結合すると BI 型 (典型的な B 型) から BII 型 (変形 B 型) に構造が変化した。

4) 土壤から調製した粘土に吸着した DNA のヌクレアーゼ耐性

細粘土に吸着したサケ精子 DNA は、粗粘土に吸着した場合よりも DNase I による分解に耐性を示し、無機質粘土よりも、有機質粘土に吸着した DNA が DNase I に分解されにくかった (Cai *et al.*, 2007)。このとき有機質粘土や細粘土に DNA は緩く吸着していたが、無機質粘土や粗粘土に強く吸着した DNA よりも DNase I に対して抵抗性を示し、DNA 分解性と吸着強度に関連性が認められなかった (Cai *et al.*, 2007)。上述したように、吸着による DNA の構造変化は、DNA 難分解化の一因とされている。この矛盾は、有機質粘土では DNase I が侵入しにくい孔隙内に DNA が吸着していることや、DNase I が有機質粘土やモンモリロナイトに多く吸着して活性が低下したことによるのかもしれない (Cai *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2007)。

4. 土壤構成成分に吸着した DNA 分子による形質転換

1) 土壤粒子に吸着した DNA による形質転換

土壤中の形質転換では、土壤粒子に吸着した DNA は脱着せず、細菌に直接取り込まれる (Lorenz and Wackernagel, 1994; Paget and Simonet, 1994)。しかし、土壤中において DNA は長期間残存するが、コンピテント細胞への取り込みが可能なのは比較的短期間である (Nielsen *et al.*, 2007)。モンモリロナイトに吸着した染色体 DNA と閉環状プラスミド DNA は、非滅菌土壤に添加してから15日間、形質転換能 (染色体 DNA, 培養開始時の頻度の 3.4 ~ 43%; 閉環状プラスミド, 25%) を有していた (Gallori *et al.*, 1994)。染色体 DNA あるいはプラスミド DNA のいずれを土壤に添加しても、3日間は高い頻度 (培養開始時の 3%) で形質転換が生じた (Sikorski *et al.*, 1998)。

3タイプの土壤でプラスミド DNA の残存性を調べたと

ころ、非滅菌状態では埴土 (clay) で、滅菌状態では壤質砂土 (loamy sand) で高く、いずれの状態でも微砂質埴土 (silty clay) では低い値を示した (Romanowski *et al.*, 1992)。 *Escherichia coli* への形質転換頻度も同様の結果であった。土壌中における *Acinetobacter* 属細菌の形質転換を調べた研究では、栄養分と土性 (とくに粘土含量) が形質転換に大きな影響を与えた (Watson and Carter, 2008)。この二つの研究ともに、粘土含量の高い土壌ほど形質転換頻度は高かった。しかし粘土に DNA が吸着すると、その形質転換頻度は低下する (Paget and Simonet, 1994)。一方、砂に吸着した場合は、DNA の形質転換頻度は増加するという研究例がある (Pietramellara *et al.*, 2006)。

第1部で述べたように、細胞外 DNA は毛管作用により水と一緒に動くため、異なる微小生息部位の細菌間で形質転換が行われる可能性がある (Pietramellara *et al.*, 2009)。

2) モンモリロナイトとカオリナイトに吸着した DNA による形質転換

粘土に吸着した DNA は、ヌクレアーゼ処理や洗浄によって形質転換能を失わないようだ。モンモリロナイトに吸着したプラスミド DNA は、DNase I 処理後も *E. coli* を形質転換する能力を有していた (Paget *et al.*, 1992)。モンモリロナイトに DNA を吸着させると形質転換頻度は低下したが、蒸留水や DNA 緩衝液 (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 4 mM NaCl (pH 7.5)) で洗浄後のモンモリロナイト-DNA 複合体は枯草菌を形質転換させた (Khanna and Stotzky, 1992)。Stotzky (2000) は、DNA の一端が粘土鉱物に吸着することで DNA の構造や電子分布が変化して難分解化するが、外側に向いている DNA の末端がコンピテント細胞に取り込まれることにより、粘土鉱物に吸着した DNA は形質転換可能だと予想している。しかし、DNA の構造変化は、ヌクレアーゼ分解耐性になる一方で、形質転換頻度も低下させるかもしれない。モンモリロナイトや有機質粘土・細粘土に吸着したプラスミド DNA に比べ、カオリナイトや無機質粘土・粗粘土に吸着したプラスミド DNA の形質転換効率は低かった (Cai *et al.*, 2007)。モンモリロナイトと有機質粘土に吸着した DNA は構造変化せず、形質転換頻度の低かったカオリナイトと無機質粘土に吸着した DNA は、B 型から Z 型に構造変化していた (Cai *et al.*, 2006)。

吸着 DNA の形質転換能は、吸着した粘土鉱物の種類だけでなく、DNA の形状によっても影響される。帯水層と *Acinetobacter calcoaceticus* を含んだマイクロコズムにおいて、染色体 DNA は鉱物に吸着しても地下水中の DNA と同等の形質転換能を示したが、プラスミド DNA の場合は吸着により形質転換能は大幅に低下した (Chamier *et al.*, 1993)。粘土鉱物 (モンモリロナイトとカオリナイト) に吸着した場合、染色体 DNA よりも、プラスミド DNA の方が乾湿サイクルによって枯草菌への形質転換能が低下した (Pietramellara *et al.*, 1997)。染色体 DNA ではモンモリロナイトに吸着した方が形質転換しやすいが、プラスミド DNA ではカオリナイトに吸着した方が形質転換しやす

かった。

興味深いことに、粘土鉱物へ吸着した時点の pH 値が形質転換頻度に大きな影響を及ぼす可能性がある。pH 1-9 でモンモリロナイトに DNA を吸着させ、pH 7.5 で枯草菌に形質転換させたところ、pH 7 と 9 で吸着させた DNA では同程度の形質転換頻度を示したが、それより低い pH で吸着させた DNA ほど、形質転換能は低かった (Khanna and Stotzky, 1992)。著者らは、低 pH で吸着させた DNA は部分的に変性している可能性を挙げている。

5. 形質転換に影響する要因

1) 細胞構成物質

実験室でよく使われる精製 DNA は、微生物が積極的に細胞外に放出した場合を除くと土壌中ではほとんど存在せず、大部分の DNA は菌体死滅後に土壌中へ放出されたものであるため、タンパク質などの他の成分と結合していると予想される。つまり精製 DNA を用いた研究では、実際の環境中での DNA の挙動を反映していない可能性がある。そこで Pietramellara *et al.* (2007) は、精製 DNA と非精製 DNA を用い、粘土鉱物への吸着や形質転換能について調査した。その結果、①モンモリロナイトやカオリナイトにゆるく吸着した DNA の量は、細胞壁残渣や他の有機成分 (タンパク質、炭水化物、脂質) の共存により増加したが、強く吸着した DNA の量は、細胞壁残渣によるみ増加し、他の有機成分が存在すると低下した；②細胞壁残渣は、DNA と粘土鉱物表面との間を架橋することで強く吸着させ、また他の有機成分は DNA を凝集・凝縮させ、粘土鉱物へのゆるい吸着を促進させた；③精製 DNA と非精製 DNA の両方において、モンモリロナイトではゆるい吸着が多かったが、カオリナイトでは強い吸着が多かった；④モンモリロナイトとカオリナイトのどちらにおいても、粘土鉱物にゆるく吸着した DNA が、粘土に吸着していない遊離状態の DNA や強く吸着した DNA より高い頻度で枯草菌を形質転換させた。*Acinetobacter* 属細菌では、DNA 以外に他の細胞成分が混ざった細胞破壊懸濁物と精製 DNA とでは形質転換効率が差がなかったが、細胞残渣が共存した DNA は土壌中で分解されにくかった (Nielsen *et al.*, 2000)。

2) 乾湿サイクル

粘土鉱物に吸着した DNA の形質転換能は、乾湿サイクル (28℃で48時間風乾し、その後2mgの粘土に蒸留水を100μL加え、28℃で24時間静置するというサイクル) によって低下する (Pietramellara *et al.*, 1997)。カオリナイトやモンモリロナイトに吸着した染色体 DNA の形質転換能は乾湿サイクルに影響されにくかった。しかしプラスミド DNA の場合は、顕著な分解や粘土からの脱着が見られないにも関わらず、1, 2回の乾湿サイクルで形質転換能を失った。

3) 有機酸、糖、アミノ酸等

土壌中での形質転換頻度には有機酸やアミノ酸は影響するが、一致した結果は得られていない。*Acinetobacter* 属細菌

を用いた実験で、根からの分泌物は土壤中での形質転換を促進しなかったが、有機酸などの成分を含んだ模擬根分泌物は形質転換に必須であった (Watson and Carter, 2008)。Nielsen and van Elsas (2001) は、土壤中での *Acinetobacter* 属細菌の形質転換頻度は、様々な有機酸や糖、アミノ酸の添加により増加することを報告している。

4) カルシウムイオン

第1部で述べたように、土壤中 Ca^{2+} 濃度は、鉱物や有機無機複合体への DNA 吸着量に影響を与え、さらには形質転換頻度に影響するかもしれない。モンモリロナイトや有機質粗粘土・無機質粗粘土・有機質細粘土・無機質細粘土に吸着した DNA の *E. coli* への形質転換頻度は、DNA 吸着時点での Ca^{2+} 濃度が高いほど、高い傾向がみられた (Cai *et al.*, 2007)。彼らは、 Ca^{2+} の架橋により DNA が伸長して細胞に取り込まれやすくなった、あるいは Ca^{2+} により DNA 分子内と分子間での静電斥力が低下することで DNA 分子がより小さい構造をとり、細胞に接触する機会が増加した可能性を挙げている。カオリナイトでは、 Ca^{2+} 存在下で吸着させた DNA による形質転換は観察されなかった (Cai *et al.*, 2007)。

5) 腐植物質

腐植酸に吸着した DNA は、枯草菌を形質転換する能力を示した (Crecchio and Stotzky, 1998)。有機無機複合体 (第1部を参照) に吸着した DNA は、枯草菌への形質転換能を有していたが、その頻度は吸着により低下した (Crecchio *et al.*, 2005)。また形質転換は、腐植酸の存在によって阻害を受けない (Nielsen *et al.*, 2000)。Paget and Simonet (1997) によると、粘土鉱物や土壌に DNA を吸着させた場合と、粘土と腐植酸の混合物や土壌と腐植酸の混合物とに DNA を吸着させた場合では、*Pseudomonas stutzeri* への形質転換頻度に差はなかった。

腐植物質あるいは有機無機複合体に吸着した DNA の残存性や形質転換能の研究は、世界的にみてもきわめて少ない。日本に広く分布する黒ボク土は多量の腐植物質を含んでおり、日本の土壌中での細胞外 DNA の挙動を理解する上で、今後のさらなる研究が必要な課題であろう。

6. おわりに

これまでの土壌中における自然形質転換に関する研究は、技術的な問題を含めた実験上の制約から、室内での単純なモデル系を利用したものがほとんどであった。当然のことながら得られた成果は、実際の土壌中のものとは大きく異なる可能性がある。今後はより野外に近い状態を実験室で再現し、その土壌中での細胞外 DNA の挙動について研究する必要がある。特にこれまでは純粋な鉱物へ吸着した DNA の安定性や形質転換能に関する研究が主体であったが、実際の土壌では大部分の鉱物は有機物と結合した有機無機複合体として存在していると考えられるため、有機無機複合体に吸着した DNA の形質転換能に関する詳細な研究が必要であろう。

現在まで、土壌粒子に吸着した DNA がなぜ分解しにく

いのか、そして分解しにくいにも関わらず形質転換が可能あるいは条件によっては形質転換が促進される理由はなにか、といった根本的な課題に対してすら明瞭な解答は得られていない。また培養可能な細菌を対象に研究が実施されており、土壌に生息する大部分の培養困難な細菌については全くと言っていいほど情報が欠如している。さらに菌類由来の DNA の挙動に関する研究例もきわめて乏しい。このように土壌中の細胞外 DNA の挙動については未解決の課題が山積しており、今後のより一層の研究の進展が待たれる。

謝 辞

本総説の作成に科研費 (基盤 (B) No.19380044, No.22380180) の助成を受けた。

引用文献

- 1) Agnelli A, Ascher J, Corti G, Ceccherini MT, Nannipieri P and Pietramellara G (2004) Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biol. Biochem.*, **36**, 859-868
- 2) Alvarez AJ, Khanna M, Toranzos GA and Stotzky G (1998) Amplification of DNA bound on clay minerals. *Mol. Ecol.*, **7**, 775-778
- 3) Blum SAE, Lorenz MG and Wackernagel W (1997) Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. *System. Appl. Microbiol.*, **20**, 513-521
- 4) Cai P, Huang Q and Zhang X (2006) Interactions of DNA with clay minerals and soil colloidal particles and protection against degradation by DNase. *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 2971-2976
- 5) Cai P, Huang Q, Chen W, Zhang D, Wang K, Jiang D and Liang W (2007) Soil colloids - bound plasmid DNA: effect on transformation of *E. coli* and resistance to DNase I degradation. *Soil Biol. Biochem.*, **39**, 1007-1013
- 6) 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
- 7) Chamier B, Lorenz MG and Wackernagel W (1993) Natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* by plasmid DNA adsorbed on sand and groundwater aquifer material. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1662-1667
- 8) Corinaldesi C, Beolchini F and Dell'Anno A (2008) Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: implications for the preservation of gene sequences. *Mol. Ecol.*, **17**, 3939-3951
- 9) 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
- 10) 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
- 11) Dell'Anno A and Danovaro R (2005) Extracellular DNA plays a key role in deep - sea ecosystem functioning. *Science*, **309**, 2179
 - 12) Demanèche S, Jocteur - Monrozier L, Quiquampoix H and Simonet P (2001) Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay - bound plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 293-299
 - 13) de Vries J and Wackernagel W (2004) Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant Soil*, **266**, 91-104
 - 14) Doolittle WF (2000) Uprooting the tree of life. *Sci. Am.*, **282**, 90-95
 - 15) Franchi M and Gallori E (2004) Origin, persistence and biological activity of genetic material in prebiotic habitats. *Orig. Life Evol. Biosph.*, **34**, 133-141
 - 16) 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
 - 17) 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
 - 18) Geigl EM, Baumer U and Koller J (2004) New approaches to study the preservation of biopolymers in fossil bones. *Environ. Chem. Lett.*, **2**, 45-48
 - 19) Haile J, Holdaway R, Oliver K, Bunce M, Gilbert MTP, Nielsen R, Munch K, Ho SYW, Shapiro B and Willerslev E (2007) Ancient DNA chronology within sediment deposits: Are paleobiological reconstructions possible and is DNA leaching a factor? *Mol. Biol. Evol.*, **24**, 982-989
 - 20) Hebsgaard MB, Phillips MJ and Willerslev E (2005) Geologically ancient DNA: fact or artefact? *Trends Microbiol.*, **13**, 212-220
 - 21) 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
 - 22) 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
 - 23) Lorenz MG and Wackernagel W (1987) Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2948-2952
 - 24) Lorenz MG and Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.*, **58**, 563-602
 - 25) Mao Y, Daniel LN, Whittaker N and Saffiotti U (1994) DNA binding to crystalline silica characterized by Fourier - transform infrared spectroscopy. *Environ. Health Perspect.*, **102**(Suppl. 10), 165-171
 - 26) Nielsen KM and van Elsas JD (2001) Stimulatory effects of compounds present in the rhizosphere on natural transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **33**, 345-357
 - 27) Nielsen KM, Smalla K and van Elsas J (2000) Natural transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 206-212
 - 28) Nielsen KM, Johnsen PJ, Bensasson D and Daffonchio D (2007) Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ. Biosafety Res.*, **6**, 37-53
 - 29) Paget E and Simonet P (1994) On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **15**, 109-118
 - 30) Paget E and Simonet P (1997) Development of engineered genomic DNA to monitor the natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* in soil - like microcosms. *Can. J. Microbiol.*, **43**, 78-84
 - 31) 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
 - 32) 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
 - 33) Pietramellara G, Ceccherini MT, Ascher J and Nannipieri P (2006) Persistence of transgenic and not transgenic extracellular DNA in soil and bacterial transformation. *Biol. Forum*, **99**, 37-68
 - 34) Pietramellara G, Ascher J, Ceccherini MT, Nannipieri P and Wenderoth D (2007) Adsorption of pure and dirty bacterial DNA on clay minerals and their transformation frequency. *Biol. Fertil. Soils*, **43**, 731-739
 - 35) 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
 - 36) 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
 - 37) Romanowski G, Lorenz MG, Sayler G and Wackernagel W (1992) Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3012-3019
 - 38) Sikorski J, Graupner S, Lorenz MG and Wackernagel W (1998) Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in a non - sterile soil. *Microbiology*, **144**, 569-576
 - 39) Solomon JM and Grossman AD (1996) Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet.*, **12**, 150-155
 - 40) Stotzky G (1989) Gene transfer among bacteria in soil. In *Gene Transfer in the Environment*, Ed. SB Levy and RV Miller, p.165-

- 222, McGraw - Hill, New York
- 41) 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
 - 42) Thomas CM and Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 711-721
 - 43) Vettori C, Paffetti D, Pietramellara G, Stotzky G and Gallori E (1996) Amplification of bacterial DNA bound on clay minerals by the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **20**, 251-260
 - 44) Vettori C, Paffetti D, Crecchio C, Walters MA, Giannini R and Stotzky G (2004) The use of FT - IR technique to study the interaction between humic acids and DNA. *Geophysical Research Abstracts*, **6**, 02890
 - 45) 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
 - 46) Watson SK and Carter PE (2008) Environmental influences on *Acinetobacter* sp. strain BD413 transformation in soil. *Biol. Fertil. Soils*, **45**, 83-92
 - 47) Willerslev E, Hansen AJ, Binladen J, Brand TB, Gilbert MTP, Shapiro B, Bunce M, Wiuf C, Gilichinsky DA and Cooper A (2003) Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science*, **300**, 791-795
 - 48) Yin X and Stotzky G (1997) Gene transfer among bacteria in natural environments. *Adv. Appl. Microbiol.*, **45**, 153-212