

# 生物の環境適応・多様性獲得に寄与する Vector Particle (VP) とは！？

千 浦 博\*

## 1. 序にかえて

2011年現在での国連環境計画による地球上の生物種類は、動物、植物、菌類種の合計870万種と推定するが<sup>27)</sup>、些か少ないと感じる。一方、地球上に生息する微生物個体数は、 $415\sim 615 \times 10^{28}$ だと推定される<sup>25)</sup>。生物の基本単位的世界的な共通認識は細胞であるから、ウイルスは生物に含まれないとの考えがあるが、ウイルスは紛れもない生物学的存在である。1989年、ノルウェー・ベルゲン大学の研究グループは海水の透過型電子顕微鏡観察から、 $\sim 10^7/\text{mL}$ 以上のウイルス様粒子(VLP: 電顕で観てウイルスの様に見えるモノ)の存在を報告<sup>3)</sup>し、それまで見過ごされていたウイルス数の膨大さ・多様性を白日の下に晒した。

この研究を端緒に、海洋VLPの驚異的量と多様性が注目され、ウイルス多様性の全貌を捉える試みが世界中で進められてきた。環境中の確実なウイルス計数は容易ではないが、地球上には総じて $10^{31}$ オーダーという数多のウイルス(VLP)が存在するとされている<sup>28)</sup>。VLPとは環境試料中に電顕観察によりウイルスの様に見える、直径20~750 nmの粒子の総称で、環境中に普遍的に数多く分布し、その構成は、真正ウイルス粒子・核酸、タンパク質を内包する細胞小胞などである<sup>17)</sup>。これらVLPの多くは核酸を内包する粒子であり、自然界での遺伝子プール<sup>23)</sup>であり、環境中での遺伝子伝播への寄与が当然注目される。ウイルスの増殖様式は宿主細胞に依存した絶対寄生性で、ウイルス-宿主関係には厳密な制限があり、1種類のウイルスが感染・増殖できる範囲(宿主域)は

殆どの場合1生物種に限られ広くとも1属を超える事はない。偶に節操なくこの宿主域を超えるもの(広宿主域という)は全ウイルス群衆中で0.5%未満である。また、栄養養情況が一般的な環境中では、溶原菌(Lysogen)がウイルス給源の主体である。Lysogenの環境中での役割は: 1. 溶原化ウイルス誘発による物質循環への材料供給: 2. 微生物相互間での形質導入粒子による遺伝物質仲介、と認識されている。しかし遺伝子伝達に関しては、形質導入粒子は不稔感染、即ち、生じた形質導入株からの粒子再生産できないので、自然界での遺伝情報伝搬に関わるagentとしてのウイルス(bacteriophages)の寄与は無視されてきた<sup>8)</sup>。ところが、ゲノム科学の進展に伴い、種々の微生物ゲノムの中に数多くの形質導入が行われた痕跡が確認され<sup>9)</sup>、形質導入粒子の環境中での寄与が俄然注目を集めるようになった<sup>1-7)</sup>。

## 2. 水平遺伝子伝達と環境VLP: Horizontal Gene Transfer (HGT) in the environment?

ゲノム解析の進展は生物ゲノム構造を俯瞰することを可能とし、特に微生物比較ゲノム学の発展は深いレベルでの進化解明を可能にし、予測を遙かに上回る環境中(*in situ*)での水平遺伝子伝達の頻度予測を明確にした。ところで、ドメイン(真正細菌、古細菌、真核生物)を超えた遺伝子伝達はどのように行われてきたのか? 従来の遺伝子伝達概念、即ち形質転換、接合、形質導入では、今日広く見られるHGT<sup>26)</sup>を説明するのに十分でない。近年Gene transfer agent (GTA)<sup>24)</sup>、

\*東京農工大学農学府農学研究院・産学官連携研究員

Membrane vesicle (MV)<sup>22, 29)</sup>, Micro-nanotube<sup>21)</sup> など新規核酸担体の報告があるが、GTA は同系統内のみでの伝播、他は HGT 能力が未解明である。

一般に生物の遺伝子伝播は、親から子に向う垂直伝播である。これに対し、同一世代の個体間での遺伝子のやりとりを水平遺伝子伝播 (HGT) という。生物多様性の獲得に不可欠な事象は変異の蓄積であるが、単なる点突然変異の蓄積だけでは、現在の多様性の実態を期待できない。即ち、生物進化と多様性獲得に大きく寄与してきたのは HGT と考えてよい。先に述べた様に環境微生物群集中での HGT への最大寄与は『接合』だと認識されている。しかし、接合装置が獲得される以前の進化段階で生物はいかにして HGT を達成していたのだろう。また自然界には裸のプラスミドは存在しない。故に既存の知識を総て動員しても説明できない。著者は通常生菌数として分離される Lysogen の中に、既知のものとは性格を異にする HGT 媒体の存在を自然界に遍く分布する VLP 群集中に広宿主域遺伝子 (情報) 伝達粒子 (vector particle: VP) を見出し<sup>10-20)</sup>、新規概念として提案し、その伝達能力発現を実証してきた<sup>20)</sup> (Fig. 1)。

### 3. VP を自然界から集める

$\alpha$ -Proteobacteria に属する一群の海洋分離細菌を長時間培養すると、定常期以降に出芽機構で VLPs が生産され培養液に蓄積した<sup>10, 11)</sup>。この VLPs は、遺伝系統が  $\gamma$ -Proteobacteria に属する受容大腸菌の平板効率を 6-96% とする致死効果を示した。この粒子を Coliphage T4 の大腸菌致死効率が 7 order 抑制される紫外線条件で処理しても、受容菌致死効果は殆ど変化せず、致死効果の発現が通常のウイルス生産に基づく溶菌とは異なる事が示唆された。また、受容菌の原栄養性復帰を指標として形質導入を検定したところ、平均  $10^{-4}$  cfu/粒子の頻度で一般型形質導入形式による形質導入株が生じた。通常の形質導入粒子と異な

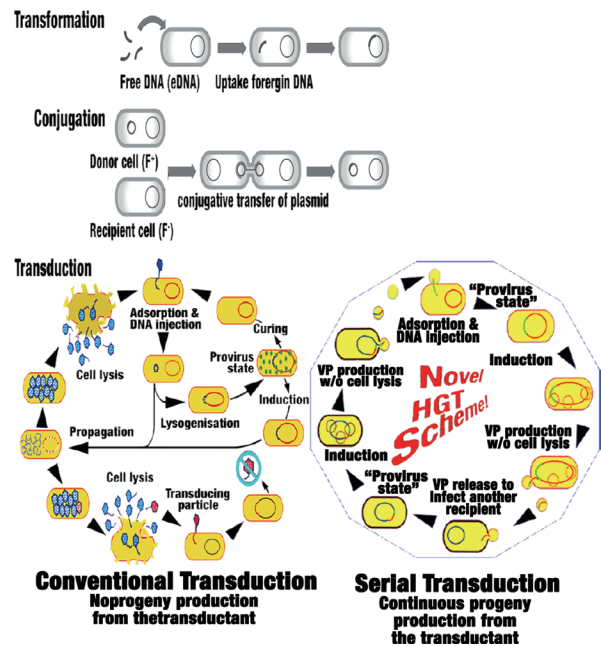


Fig. 1 A schematic representation of “ordinary” and “serial transduction”. The left panel shows the life cycle of lysogens and the production of transducing particles. Note that transducing particles would not be capable of producing progeny from the transductant. The right panel shows the serial transduction with the aid of the broad-host-range vector particle (VP) discussed in this article. Transductants generated with the VP acquire VP production without accompanying cell lysis, whose reproduced VP can carry out successive transduction as the serial transducing particle.

り、これらの VLPs により得られた形質導入株は粒子生産能を獲得し、元の粒子と同様の受容菌致死効果と遺伝子伝達能を示した。現在までに、海洋細菌  $\alpha$  &  $\gamma$  Proteobacteria : 22 種, 好熱硫黄酸化細菌 *Aquifex* : 1 種, 超高熱古細菌 *Thermococcus* : 1 種から出芽機構による粒子生産を確認した<sup>10, 15)</sup> (Fig. 2)。

#### 高熱水圏からの試料採取地点：

- 地下熱水噴出孔 豊羽鉦山, -550 m level  
42°50' N, 141°02' E
- 温泉：中の湯温泉, 36°12' N, 137°36' E
- 海底熱水噴出孔：水曜海山, APSK5, 28°34' N, 140°38' E -1382 m
- A boring core, APSK06, 28°34'N, 140°39'E, -1386 m

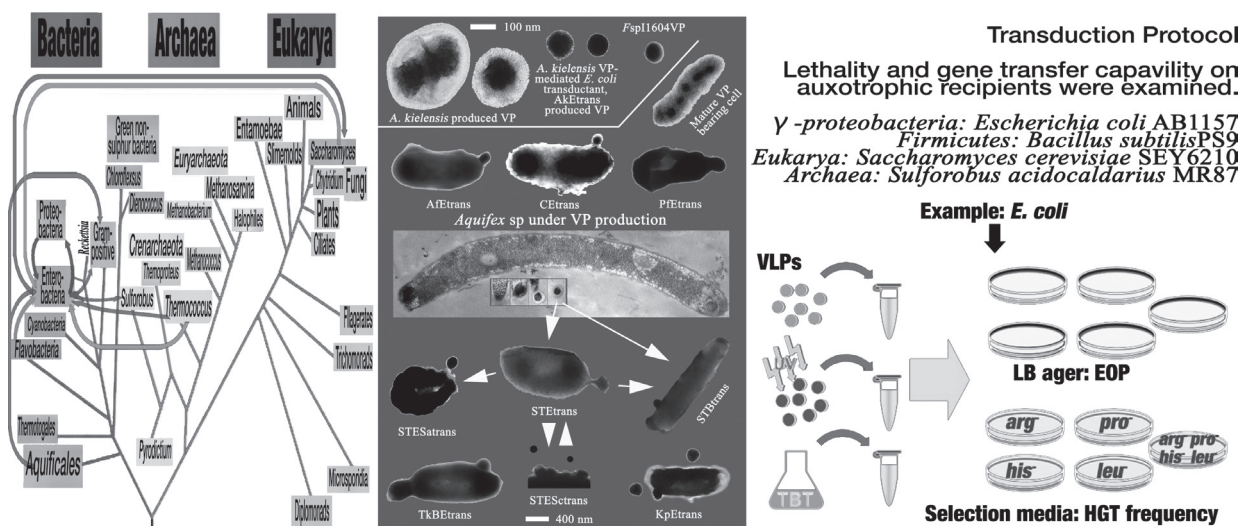


Fig. 2 Transkingdom gene transfer of VP with a specific reference to VP-EM images and transduction protocol.

A boring core, APSK06, 28°34'N, 140°39'E,  
-1386 m Temp. ca. 250°C

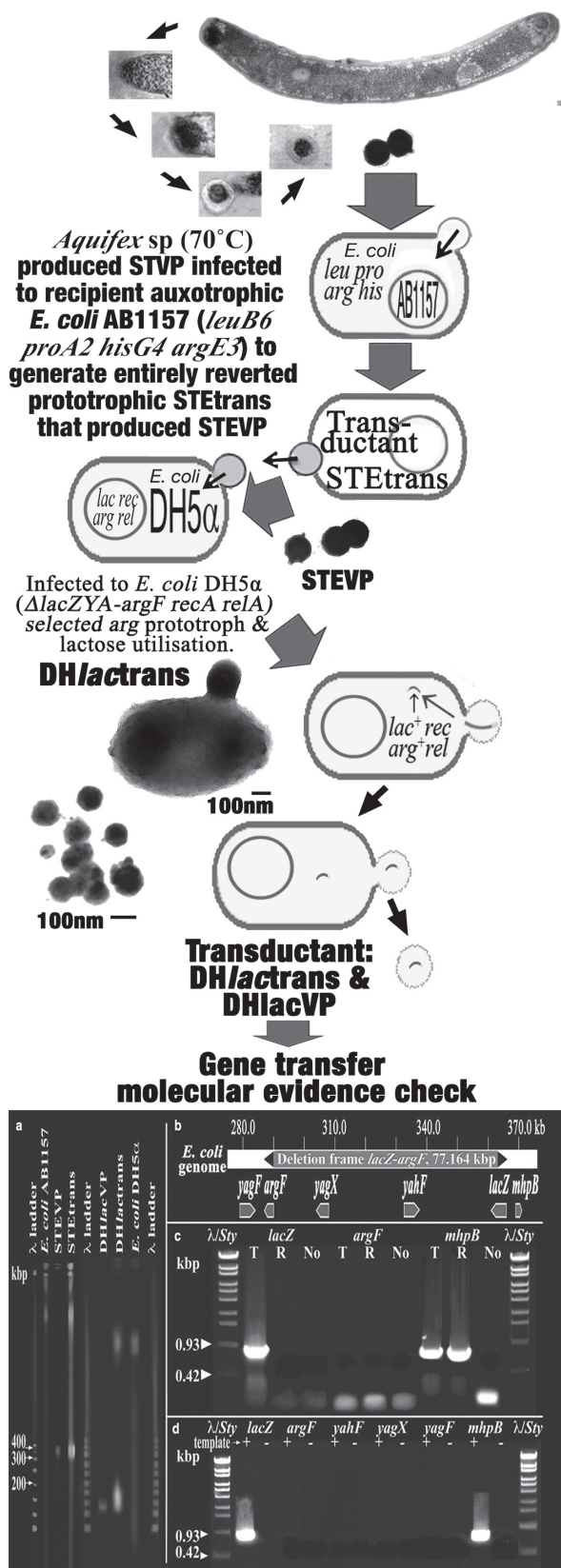
海洋細菌由来の粒子を phyla を異にする枯草菌を受容菌として検定すると、致死効果は確認できたが遺伝子伝達は確認できなかった。そこで、より系統的に分岐の深い系統に属する細菌から生産された該粒子の特性を検討した (Fig. 2, 3)。温泉硫黄芝形成主体で人工培養出来ない *Aquifex* は、温泉源泉水中に海洋細菌由来の粒子に酷似した VLPs (ST-VLP) を生産することを見いだした<sup>13)</sup> (Fig. 2)。ST-VLP は phyla を異にする受容大腸菌に対して群集密度を高々1 order 下げる致死効果を示すと共に、約  $10^{-4}$  cfu/粒子の頻度で形質導入株を生じた。この形質導入株 (STEtrans) は上記海洋細菌の場合と同様、粒子生産能を獲得した。STEtrans が生産した STEVP<sup>5)</sup> は、枯草菌へも遺伝子伝達が可能で、枯草菌から再生産された粒子も同様の特性を示した (Fig. 2)<sup>13, 14)</sup>。さらに STEVP は、受容菌として *E. coli*, *B. subtilis* 以外に、酵母 *S. cerevisiae*, 古細菌 *S. acidocaldarius* に対し受容菌致死効果と遺伝子伝達能を示し、得られた形質導入株からの同様の粒子生産が確認出来た (Fig. 2)。STEtrans の 30~37°C での生育状況を受容菌である *E. coli* と比較すると、最大到達細胞密度が受容菌のそれと較べて、約 40% に

抑制された<sup>7)</sup>。出芽機構で生産されるこれらの粒子の大きさは、形質導入実験に VP 粒子径を分級し可及的に均一化して用いても、次世代の形質導入株から再生産される粒子径は均一ではなく、STEtrans の場合に生産された STEVP は5種類の異なった粒子径への分布が観測された<sup>15)</sup>。特に高熱環境から発見されたそのような非特異的遺伝子伝播媒介粒子は普遍的な存在で、進化の多様化と種分化への寄与の証拠である。現存する従来型ウイルスは、外套形成に与る遺伝子の利己的な維持に特化して進化し、その結果、特定の宿主域に制限された可能性がある。

「形質導入」は、世界的な自然環境での細菌や他の生物集団の遺伝子構造形成と進化に大きな影響を与えただろう。環境中に保存されている「広宿主域遺伝子伝達粒子：VP」は、初期進化の歴史段階で遺伝資源の保存と微生物群集への新規遺伝子の分配という主要な役割を果たしたと考えられる祖先の「遺伝子輸送装置」の後裔である。

#### 4. VPは何を伝達するか

VP は栄養要求性突然変異株を原栄養性に変化させたが、遺伝子が確かに転移したかを確認のため受容菌に deletion mutant (*E. coli* DH5 $\alpha$ : F,  $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*( $r_K$ ,  $m_K$ ), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ ,



**Fig. 3** Generation of transductant using deletion mutant, *E. coli* DH5 $\alpha$ , to examine the molecular evidence of gene transfer and PCR amplification of target genes in DH/lactrans.

*thi-1*, *gyrA96*, *relA1*; *E. coli* JM109: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*( $r_K^-$ ,  $m_K^+$ ), *e14* (*mcrA*), *supE44*, *relA1*,  $\Delta$ (*lac-proAB*)/F'(*traD36*, *proAB*<sup>+</sup>, *lac I*<sup>o</sup>, *lacZ* $\Delta$ M15)) を選んで検討した。また、VPによるプラスミド伝達の可能性を、プラスミド保有菌からプラスミドを持たない菌への一連の形質導入過程でプラスミドの抽出を行い検討した。プラスミド保有菌株として、pBR322と *E. coli* DH5 $\alpha$  [ $\Delta$ (*lacZYA-argF*), *relA1*, *recA1*] の形質転換株 *E. coli* DHamp<sup>r</sup> に *E. coli* DH-lactrans 由来の VP を感染させ、得た *E. coli* DHamp<sup>r</sup>-*lac-trans* をあらかじめ作成し用いた。*E. coli* DHamp<sup>r</sup>-*lac-trans* はラクトース培地上でのラクトース資化性により選択し生じた菌株への欠損遺伝子転移をアガロース電気泳動像として確認した (Fig. 3, 5)。ところが、該菌株はアンピシリン添加 LB 培地では正常にコロニー形成を行うものの、ラクトース培地では生育不全が生じ、産生された VP 中のプラスミド抽出とそれに続く導入実験によるプラスミドの導入確認には至らなかった。

これまでに海洋・海底熱水噴出水・地下並びに地表熱水・陸水・植物根圏などから VLP とその生産菌を採取し、受容菌に栄養要求性一大腸菌・枯草菌を主に用いて形質導入を行い、原栄養性復帰を指標に得た形質導入株の培養中に出芽粒子生産を確認した結果<sup>12)</sup>、これまでに VP 媒介形質導入株として 34 株を獲得した内容は、2019 年 2 月に発表した総説に集約した<sup>20)</sup>。

温泉硫黄芝を形成する好熱硫黄酸化細菌 (*Aquifex* sp) 由来 VP をグラム陰性桿菌 *E. coli* AB1157 を受容菌として感染させると VP 媒介形質導入株 (STEtrans) が生じる事実は、門を超えた連続形質導入の好例である<sup>19)</sup>。STEtrans が生産した STEVP (112 $\pm$ 17.4 nm; 373.3 $\pm$ 23.2 kbp) をグラム陽性桿菌 *Bacillus subtilis* PS9 栄養要求性突然変異株に MOI: 0.1~1.0 で感染させ、*met*, *trp*, *lys*, *leu*, *his* のアミノ酸要求性復帰を指標に検定し、平均 2.5 $\pm$ 1.9  $\times 10^{-9}$  CFU/VP の導入頻度

で枯草菌導入株 STEBtrans を得た<sup>14, 20</sup>。

栄養要求性回復に要する少数の遺伝子より大規模な遺伝子形質導入が行われている可能性を明らかにするために、好熱・好冷菌由来の VP を中温性受容菌へ形質導入し、生じた形質導入株の生育温度特性から耐冷・耐熱性の獲得を指標として検討した。具体的には、好熱硫黄酸化細菌 *Aquifex* と超高熱古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来 VP で製作した大腸菌形質導入株 (STEtrans, DHlactrans; KDEtrans) (Fig. 4 a), 好冷菌 *Polaribacter filamentus* 由来 VP で製作した大腸菌形質導入株 (PfEtrans) (Fig. 4 b) はそれぞれ温度耐性 (STEtrans, DHlactrans; KDEtrans は 50°C で colony 形成可能で 70°C でも増殖可能; PfEtrans は受容大腸菌に比べ至適温度が 7°C, 生

育範囲は 0°C まで低下) を獲得できたことを示した (Fig. 4)。これにより、それぞれ高温条件あるいは逆に低温条件で生育を可能にする細胞制御様式が導入された株を得たと判断した<sup>20</sup>。

至適 10°C の好冷海洋細菌 *P. filamentus* を海洋細菌用培地 ZoBell で培養すると PfVP (~150 kbp) 粒子を出芽生産し、この粒子を MOI 5 で栄養要求性 *E. coli* AB1157 [*F*<sup>-</sup>; *leuB6 proA2 his-4 argE3*] に感染させると受容細胞致死性を示さず、全ての栄養要求性遺伝標識が復帰し VP 産生を示す形質導入体 3 株 (PfEtrans) を生じた。さらに PfEtrans を、大腸菌が増殖できない ZoBell の 10°C で培養すると、増強された増殖  $\sim 2 \times 10^9$  cells/mL を示し、生育至適温度 30°C, 生育許容温度範囲 0~37°C を示した。したがって、

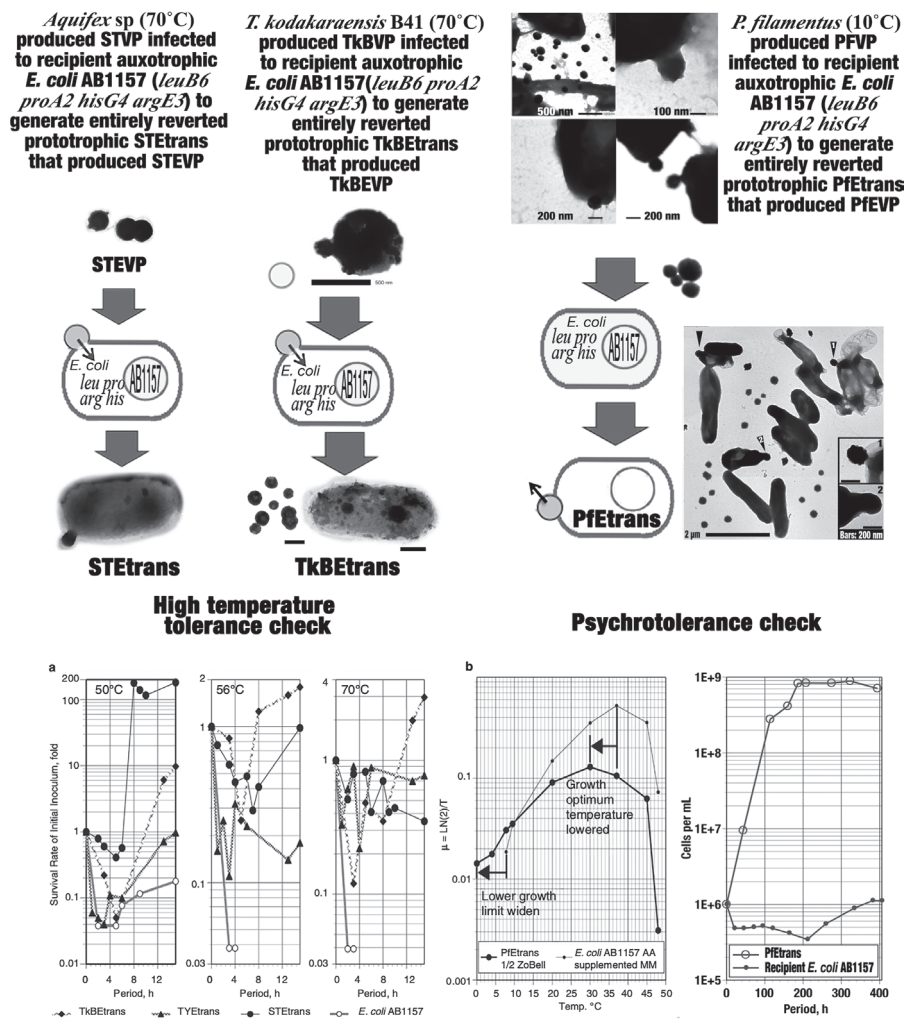


Fig. 4 Restricted growth temperature tolerance acquisition with VPs originating thermophilic and psychrophilic microorganisms.

大腸菌生育の許容範囲 (7~42°C) と至適温度 (37°C) は *P. filamentus* 由来の VP 形質導入後に低温側へシフトし, 大腸菌は PfVP 感染で生育温度範囲を広げ高浸透圧耐性を獲得した<sup>20)</sup> (Fig. 4b).

形質導入株 PfEtrans ゲノムサイズは東京農工大学生物資源ゲノム解析拠点の協力により, 453,760 bp となり, 受容 *E. coli* AB1157 株よりも 0.74% (34,415 bp) 増加したが VP 供与株 *P. filamentus* との相同遺伝子配列は見出せなかった. また, ストレス応答と浸透圧調節等の関連遺伝子群の増強と, リボゾーム RNA 遺伝子 (*rrn*) とその調節領域で 1 塩基多型 (SNP) と塩基挿入欠失 (InDels) が高頻度で生じた. 10°C 対数増殖期の世代時間 (T = 13.4 h) に基づく継代 T<sub>n</sub> = 29, 356, 454, 6681 培養で genomic 島の再編が起こった (Chiura 2023 unpublished data).

接合伝達手法より予測した VP 生産推定領域には, CP4-6 integrase や Inovirus Gp2 resolvase 等可動因子タンパク質が分布した<sup>20)</sup>.

遺伝子伝達の分子的確認に供した *lac* 導入株の β-galactosidase 活性を確かめるべく, ブルーホワイトスクリーニングを行った結果, 初回の実験で

は 7.7% のコロニーが青色を呈色したが, 同コロニーに対し再度行った実験では青色コロニーは見られず, これらの結果から, *lac* 導入株 β-galactosidase 活性が極端に低下しているものとして, また, 類似な現象が *E. coli* JM109 [*relA1*, *recA1*] を受容菌とした際も起こる事から *lac* 導入株の生育不全の理由は, *relA1* 遺伝子による制御と VP 由来遺伝子との間で干渉が生じるように解釈できる.

## 5. VP 生産遺伝子 (群) はどこにあるのか

VP 形質導入機構を知るには VP 生産遺伝子の解明が必須である. VP 粒子生産に関わる遺伝子 (PPRG: Particle Production Responsible Gene) は VP 生産性を獲得した形質導入株の染色体上遺伝子のどこかにあるはずである. VP は通常, *recA*<sup>+</sup> の受容菌で, VP 由来の遺伝子は相同組み換えにより宿主ゲノムへの挿入が行われるものと考えるが, VP 由来の遺伝子は宿主染色体の位置特異的部位に挿入がなされるのだろうか. この仮説を確認し PPRG 座位を明らかにするため, VP 生産性のある高頻度組み換え型大腸菌 (Hfr) を

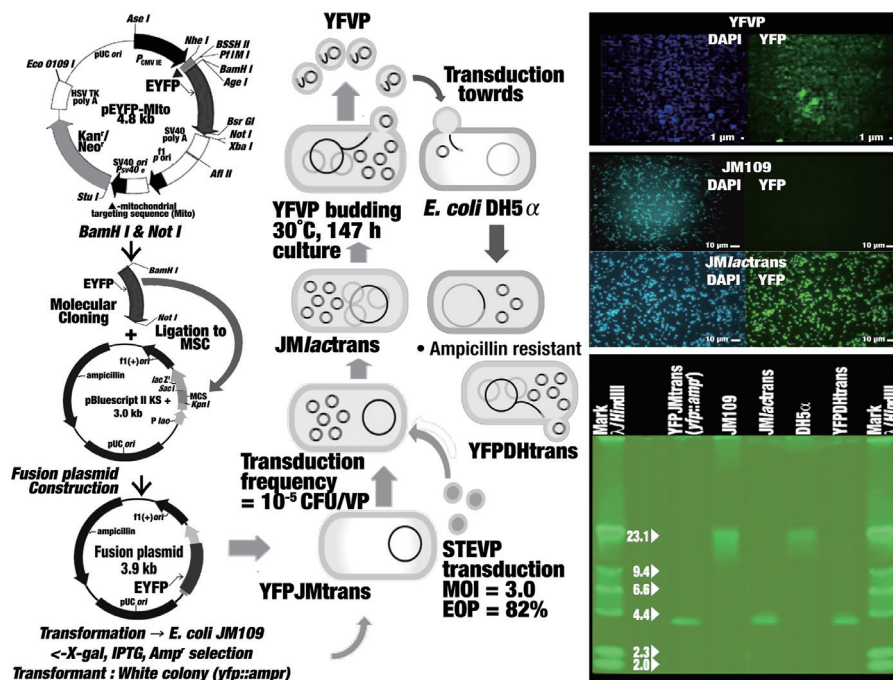


Fig. 5 Construction of *yfp:ampr* plasmid for examining VP capability to transfer plasmid and cytoplasmic materials other than chromosomal nucleic acids.

作り、複数の栄養要求性を保持する受容株に接合し、栄養要求性の復帰パターンから PPRG 座位を推定する方法が適当と考えた。そこで、まず VP 生産性高頻度組換え型大腸菌 (HfrC) を得るため STEVP<sup>16)</sup> を *E. coli* W2252 株 (HfrC; *metB*<sup>Δ</sup> *Sm*<sup>r</sup>) に感染させ、VP を生産する形質導入株 Hfr *met trans* を作製した。

次いで、Hfr *met trans* (供与菌) と受容大腸菌 AB1157 (F<sup>-</sup>; *leuB proA hisG argE Sm*<sup>r</sup>) を接合させたところ、*hisG argE* の接合体生成頻度は VP 非感染の HfrC と F<sup>-</sup> との接合対照に匹敵したが *leuB* は 4 桁低下し、*proA* は検出できなかった。さらに、生じた接合体の約半数が粒子生成が不能で、また *pro* 以外の *leu arg his* 標識に連鎖が観察された。この形質導入株からの粒子生産現象は、Hfr *met trans* 染色体上に PPRG が組込まれた証拠である。

HfrC 接合による遺伝子導入は、大腸菌連鎖地図 13' 開始点から反時計回りに進行し、*proA* (16.6010') *leuB* (12.7966') は、*argE* (0.5391') 以前に受容菌に転座するので、Hfr *met trans* の受容菌への接合で、*pro* 以外の標識に連鎖が観察されたことから、*proA-leuB* は *hisG* (55.9803') と伝達末端 (13') 間で組換えられ PPRG は *proA-leuB* 遺伝子座近傍に組込まれたと考えられた。このことより VP の Hfr への感染での PPRG 配列の受容菌への組込みは、相同組換ではなく認識配列/挿入配列の介在が想定され、これまでの知見を踏まえ染色体上の *pro-leu* 座近傍に占座する P22 phage (*attP22*: 17.0365') 付着領域 (12.7966 ~ 16.6010') 内に遺伝子が占座すると推定した。現在ゲノム配列解析を実施中の受容大腸菌 *E. coli* AB1157・好冷菌 *P. filamentus* 由来 VP 媒介大腸菌形質導入株 (PfEtrans) に基づくと、PPRG 推定座位には cryptic prophage CP4-6 の IS5 様 integrase が占座する予備的知見を得て、HfrC (w2252) 株の該当部分でも同様の構造を確認できた。(Fig. 6)

仮に VP 由来遺伝子が *recA* の存在に拘わらず

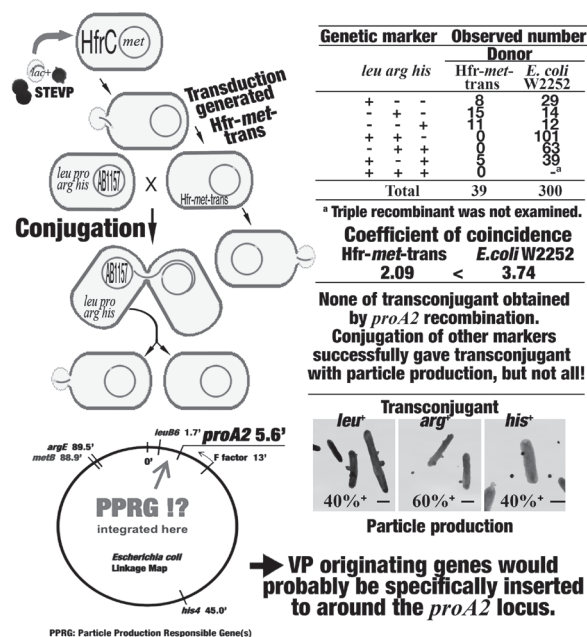


Fig. 6 Prediction of the VP particle production responsible gene locus in the *E. coli* chromosome utilizing conjugative transfer.

位置特異的挿入が行われるとした時、ファージで見られるような挿入遺伝子群の自立的複製が多重に生じる可能性がある。VP 由来遺伝子が菌体内でこうした振る舞いをした場合、同時に挿入された *lac* 遺伝子が多重複製される。この仮説は結果として *lac* プロモーターを含んだ遺伝子の大量複製から、*lac* オペロンのポジティブコントロールの頻度の相対的な低下、 $\beta$ -galactosidase の発現量の極端な低下を引き起こす現象に対しての説明を可能にする。

宿主の生育温度への適応、VP 出芽生産と一般型形質導入の関連遺伝子転移を明らかにすべく行った、PfEtrans, *P. filamentus* ATCC 700397<sup>T</sup>, *E. coli* AB1157, *Acholeplasma laidlawii* と pleomorphic virus の比較ゲノム解析は、PfEtrans が受容 *E. coli* AB1157 と 98.7%, VP 給源 *P. filamentus* と 35.6% のアミノ酸配列相同性を示し、10°C での耐塩・耐冷性と高成長率の獲得は、ストレス応答代謝関連遺伝子の増強に起因し、出芽に必須な膜タンパク質はウイルス性ではなく細胞起源であることを示唆した。

## 6. まとめと展望

VP は、染色体遺伝子、プラスミド、細胞質性物質を広い系統範囲（古細菌－細菌－真核生物）の受容細胞に転移するが、VP 産生遺伝子（群）= PPRG は現在まで同定されていない。

### VP の特徴：

- 1) 粒子の UV 処理に関係なく、VP 感染による受容細胞の最大致死率は約 10%.
- 2) 宿主染色体断片 (dsDNA, 約 400 kb) を、最大  $1.2 \times 10^2$  CFU/VP という高頻度の一般型形質導入を伴い、幅広い系統範囲の受容細胞に転移する.
- 3) 連続形質導入と呼ぶ、VP 媒介形質導入体からの子孫 VP 産生<sup>18)</sup>.
- 4) VP は、宿主細胞を溶解することなく宿主の定常期に出芽生産を開始する.
- 5) 娘粒子は種々の離散サイズ分布を示す.
- 6) VP を明らかにする唯一の方法は VP 媒介形質導入体の電子顕微鏡による出芽観察で、VP 生産高は、細胞あたり  $3 \pm 2$  粒子と厳密に規制されている.

VP の概念は著者らのグループが世界で初めて提唱したもので、既に種々関連する論文を公表してきた。これまでの HGT 概念では系統的に広い範囲の遺伝子伝播を十分に説明できなかったが、それを可能にする概念としてウイルス研究者、微生物生態学者らの注目を得てきた。しかし、その生産遺伝子、すなわち PPRG が不明なゆえに、十分な評価が得られていない。今後 VP 形成関連の遺伝子群を明からになり、その普遍性が証明されれば、系統的に遠く離れた生物相互で遺伝子の水平伝搬を担う新たなメカニズムとして、広く教科書に記載されるべきインパクトを持つであろう。それにより、生物全体の進化過程と多様性および種の創生過程の理解に全く新しい情報と解釈を与えるものと期待される。ゲノム解析技術の進展は目覚ましく、植物病理学、土壤微生物学、菌類学、

発酵工学、農薬科学、昆虫科学などが対象とする複雑な生物間相互作用の研究分野にも浸透している。本研究により、広範囲な遺伝子水平伝搬は、広範な生物圏において生じていることは想定範囲内であるが、人為的な農業生産活動により、その頻度が影響を受けることも予想され、新たな生物制御科学、生産科学分野が拓かれることが期待できる。VP の生産制御や構成関連遺伝子群の解明を継続中であるが、VP は細胞性生物に広く分布する機構で、生物の環境適応および多様性獲得、即ち環境適応に寄与し環境型 (Ecotype) 形成を可能にする。

### References

- 1) Albritton WL, Setlow JK, Slaney L. (1982) Transfer of *Haemophilus influenzae* chromosomal genes by cell-to-cell contact. *J. Bacteriol.* 152: 1066-1070.
- 2) Amy PS, Schulke W, Fraizer LM, Seidler RJ. (1985) Characterization of aquatic bacteria and cloning of genes specifying partial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1237-1245.
- 3) Bergh  $\Phi$ , Børshheim KY, Bratbak G, Heldal M. (1989) High abundance of virus found in aquatic environments. *Nature* 340: 467-468.
- 4) Bertram J, Stratz M, Durre P. (1991) Natural transfer of conjugative transposon Tn916 between gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 173: 443-448.
- 5) Bopp LH, Chakrabarty AM, Ehrlich HL. (1983) Chromosome resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 155: 1105-1109.
- 6) Børshheim KY., Bratbak G, Heldal M. (1990) Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 352-356.



- 7) Børshøj KY. (1993) Native marine bacteriophages. *FEMS Microbiol. Ecol.* 102: 141–159.
- 8) Brisson-Noel A, Arthur M, Couvalin P. (1988) Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 1739–1745.
- 9) Brown MJ, Lund PA, Nibhriain N. (1989) Mercury resistance in bacteria. in “Genetics of Bacterial Diversity”, ed. by D. A. Hapwood and K. E. Chater. Academic Press, Inc. New York. pp. 121–139.
- 10) Chiura HX. (1997) Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria. *Aquat Microb Ecol* 13: 75–83.
- 11) Chiura HX, Belimirov B, Korure K. (2000) Virus-Like particles in microbial population control and horizontal gene transfer in aquatic environments. In: *Microbial Biosystems: New Frontiers*. Bell, et al. (eds) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, pp. 167–173.
- 12) Chiura HX, Umitsu M. (2000) Isolation and characterisation of broad-host range gene transporter particles from geo-thermal vent of Toyoha Mine. *Microbes Environ* 19: 20–30. <https://doi.org/10.1264/jsme2.19.20>
- 13) Chiura HX, Yamamoto, D Koketsu, H Naito, K Kato. (2002) Virus-like particle derived from a bacterium belonging to the oldest lineage of the domain bacteria. *Microbes Environ* 17: 48–52.
- 14) Chiura HX. (2002) Broad host range xenotrophic gene transfer by virus-like particles from a hot spring. *Microbes Environ* 17: 53–58.
- 15) Chiura HX, M Umitsu. (2004) Isolation and characterisation of broad-host range gene transporter particles from geo-thermal vent of Toyoha Mine. *Microbes Environ* 19: 20–30.
- 16) Chiura HX. (2004) Novel broad-host range gene transfer particles in Nature. *Microbes Environ* 19: 249–264.
- 17) Chiura HX. (2006) Novel gene mediator originating from thermophiles in the environment, *J Jpn Soc Extremophiles.* 5: 75–9.
- 18) Chiura HX, Uchiyama N, Kogure K. (2009) Broad-host range gene transfer particle produced by *Aliivibrio fischeri*. *Microbes Environ* 24: 322–329.
- 19) Chiura HX, Kogure K, Hagemann S, Ellinger A, Velimirov B (2011) Evidence for particle-induced horizontal gene transfer and serial transduction between bacteria, *FEMS Microbiol Ecol* 76: 576–591 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01077.x>, 2011.
- 20) Chiura HX (2019) Overlooked “broad-host range vector particles” (VPs) in the environment. In: *DNA Traffic in the Environment*. Oshima T, Nishida H. (eds) Springer-Nature, Heidelberg, pp. 135–196.
- 21) Dubey G, Ben-Yehuda S. (2011) Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell.* 144(4): 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.015>.
- 22) Haurat MF, Elhenawy W, Feldman Mario F. (2015) Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles. *Biol Chem.* 396: 95. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0183>.
- 23) 木村資生 生物進化を考える, 岩波新書 ISBN: 9784004300199, 1998.
- 24) McDaniel L., Young E, Delaney J, Ruhnau F, Ritchie K, Paul J. (2010). High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. *Science*, 330(6000): 50–50 <https://doi.org/>

- 10.1126/science.1192243
- 25) 地球上に生息する微生物個体数 <https://typeset.io/questions/what-is-the-current-estimate-of-the-number-of-microorganisms-5e0dhud0hi>
- 26) HGT in bacteria <http://biobabel.wordpress.com/2012/01/24/novel-modes-of-lateral-gene-transfer-in-bacteria/>
- 27) 生物種合計 <https://tenbou.nies.go.jp/news/fnews/detail.php?i = https://www.unep.org/>
- 28) Suttle CA. (2007) Marine viruses– Major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol* 5: 801–812.
- 29) Yaron S, Kolling G, Simon L, Matthews K. (2000) Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 66: 4414–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4414-4420.2000>.