

## 総説

## 核酸多型解析を用いた遺伝子組換え植物の土壌微生物相影響評価法

池田成志・伊藤 希・渡邊和男

筑波大学遺伝子実験センター, つくば市, 〒305-8572

## Soil Environmental Assessment of Transgenic Plants by using Nucleic Acid Fingerprinting Analyses

Seishi Ikeda, Nozomi Ytow and Kazuo N. Watanabe

Gene Research Center, Univ. Tsukuba, Tsukuba 305-8572, Japan

## キーワード

環境影響評価, 核酸多型解析, 遺伝子組換え生物, 土壌 DNA, 土壌微生物群集

## はじめに

微生物から動植物にわたる様々な遺伝子組換え体のうち、現時点で実用化されているのは遺伝子組換え微生物を利用した酵素や薬用成分、生体材料生産などの工業的用途がほとんどであり、これらの応用では遺伝子組換え生物はあくまでも特定の施設内の閉鎖環境で管理されている (Cherry and Fidantsef 2003, Kopeček 2003, Walsh 2003)。一方、食料問題や環境汚染問題を解決する手段の一つとして、遺伝子組換え生物の屋外利用 (第1種使用) が検討され始めている (<http://www.bch.biodic.go.jp/>)。遺伝子組換え生物の屋外利用では、開放系である環境中への遺伝子組換え生物の放出が不可避である。組換え体の野外放出にともなうリスクアセスメントとして OECD の議論および指針や UNEP のガイドラインがあるが (渡邊 2000)、生物多様性条約バイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書 (<http://www.biodiv.org/biosafety/>) の発効に伴い、条約を批准した世界各国で同議定書に対応する国内法令が整備されつつある (渡邊・藤村 2003)。一方、海外では作物を主とした多数の遺伝子組換え体について、大規模な試験栽培及び大面積圃場での実用栽培が既に行われており (James 2003, Watanabe 2003)、遺伝子組換え体の国内での利用のみならず流通も含めて問題となったことは記憶に新しい。こうした現状に対処するためには、組換え体の環境影響評価を法的に規定するだけでなく、科学的な証明を伴った実効的な手法として確立する必要がある。熟慮された科学的な影響評価ならびに情報提供は、当該分野の研究開発や技術による産物の利

用・流通が社会的コンセンサスを得るために必須のステップでもある (渡邊 2001)。しかしながら、現状では遺伝子組換え生物に対する汎用的な環境影響評価法を効率的に行う方法が確立しているとは言い難く、現時点で想定される一通りの項目について評価し得るのは、経済的・人的に十分な資源を持つ研究機関に限られる。

環境影響評価の中でも土壌微生物相に関する評価は特に難しいものの一つである。この困難さは、主として土壌微生物相に関するわれわれの理解不足に起因する。これは、微生物の単離培養を前提とする従来法では、天然環境中に存在する微生物の多くを占めるといわれる難培養性微生物が取り扱えないことによる部分が大きい。近年、土壌からの核酸抽出法の登場により従来法のみによるよりは対象となり得る分類群が飛躍的に広がりつつある。しかしながら、多様な土壌微生物に対する核酸抽出法や、それにつづく解析法のバイアスも指摘されており、肉眼的に確認できる生物の個体数密度調査ほどに確立した手法であるとは言い難い。

遺伝子組換え植物の環境への影響評価は、花粉や種子の飛散による組換え遺伝子の野外への流出、除草剤耐性やストレス耐性等の遺伝子組換え植物の雑草化問題などの地上部での影響評価と、根圏を中心とした土壌環境中での土壌生物への組換え遺伝子の水平伝達や遺伝子組換え植物による不測の他感作用物質の産生による土壌生物への影響評価とに大別できる。特に一般消費者の関心も高いために遺伝子組換え植物の実用化が検討され始めた当初から、遺伝子組換え植物の環境影響評価の重点は遺伝子組換え植物からの花粉の飛散による導入遺伝子の非組換え植物への移行、拡散メカニズムの解析や雑草化などの地上部の問題に重点がおかれてきた。現時点では、主要な栽培植物について、野外での遺伝子組換え体の利用を前提とした花粉の動態調査、訪花昆虫に対する影響

編集委員：山岸 博

2004年8月23日受領 2004年12月20日受理

Correspondence: siked@gene.tsukuba.ac.jp

等に関する調査がなされており、花粉の生存時間や飛散距離を考慮した栽培に関するガイドラインも策定されつつある (Ammann and Jacot 2003). また、導入遺伝子の拡散に対する育種工学的解決法として、遺伝子組換え植物体上での花粉の形成や生殖繁殖をコントロールする遺伝子工学的手法も利用可能な段階となっている (Williams 1995, Daniell 2002).

この様に、地上部については遺伝子組換え植物の環境影響評価に関する情報・技術が蓄積され始めているのに対して、遺伝子組換え植物が土壤生態系に及ぼす影響に関する研究は近年まで非常に立ち遅れていた。土壤生態系の研究が遅々として進まなかった最も大きな原因は、難培養性のものを含めた土壤中の多種多様な微生物群に対して幅広く利用可能な解析技術が存在しなかったためである。従来の微生物学的手法では、土壤の生態系を解析するためには種々の微生物群のうち、実験的に培養可能なごく一部分 (全体の 1% ともいわれる) に対する個別の解析結果に基づいて土壤生態系全体の動態を間接的に推定せざるを得なかった。近年の機器分析法の発展に伴い、培養によるバイアスを伴わない微生物多様性評価法として、各微生物群に特異性が見られる生体成分を対象としたリン脂質脂肪酸プロファイルやキノンプロファイル法が提案されている (Minnikin *et al.* 1984)。これらの方法では対象とする生体成分の生合成系が各微生物群で厳密に制御されていることを前提としているが、既に例外の存在も知られており (Lechevalier 1977)、生理状態に依存しないより直接的な方法が必要とされてきた。このような背景のもと、他の生物学の諸分野と同様に分子生物学的解析法の導入により微生物生態学は大きな変革を受けた。従来の解析法では不可能である難培養性のものも含めた土壤微生物生態系の定性的・定量的解析に基づいた土壤微生物相の多様性研究が可能となり、環境中に存在する微生物群集に関する情報が蓄積され始めている。特に従来の手法では解析不可能であった土壤中の難培養性微生物群の存在が土壤微生物群集構造の多様性に大きく影響していることが明らかとなる中で (Ammann *et al.* 1995)、土壤からの核酸の分離分析法は今後の土壤微生物生態研究の必須技術となってきた。

このような状況の中、EU では遺伝子組換え生物の屋外等開放系での利用に関する環境への影響評価のガイドラインが分子生態学的な観点から検討されている (European commission 2001)。北米では遺伝子組換え生物に限定せず、環境への影響が心配される移入種を含めた幅広い新規生物種の取り扱いについても分子生態学的知見が環境リスクアセスメントの一項目として検討されつつある (National Research Council 2002)。現在の日本国内の遺伝子組換え生物に関する環境リスクアセスメントには、近年の環境微生物研究に関する新知見が反映されておらず、先進諸外国に対して法的にも学術的にも大変立ち遅れている。そこで、本総説では研究の進展の著しい過去

約 10 年間にわたり土壤微生物群集研究で広く使用されているリボソーム RNA 遺伝子を用いた分子生態学的解析手法に関する現状と、遺伝子組換え植物の開放系圃場での栽培を前提とした、それら手法の遺伝子組換え植物の土壤環境に対する影響評価への利用における問題点について以下に述べる。

## サンプリング

土壤の微生物相の解析は土壤試料の採取から始まるが、この際、土壤の水平方向および垂直方向の両方について均一性を検討する必要がある。遺伝子組換え植物の圃場試験区を含む耕作土では耕運作業などにより水平方向への均一性は比較的保たれていると考えられる。しかしながら、垂直方向については土壤中の酸化還元状態、施肥にともなう各種化学成分分布の不均一化などの要因により表土からの深度による微生物相の変化が予想され、実際に土壤深度の違いによる微生物群集の構成微生物種の変化が報告されている (Lüdemann *et al.* 2000, Griffiths *et al.* 2003)。また、特定の遺伝子組換え植物では導入遺伝子の種類あるいは染色体上の導入部位の違いにより根系の発達が野生型植物と大きく異なることも十分考えられる。したがって、現状の遺伝子組換え植物作成技術の利用範囲においては植物体側の検討要因として個々の遺伝子組換え個体毎に根の表現型の違いに注意を払い、それに対応した土壤深度の違いによる微生物群集の構成微生物種の変化を検討する必要がある。

これまでに、分子生態学的手法による遺伝子組換え植物の土壤環境への影響評価が報告されているが、それらの報告では根圏土壤微生物の群集構造に関する解析結果のみが述べられている。根圏土壤では植物の根系に伴って特異的に発達する微生物群集構造が観察され、この構造について植物種毎の特異性も知られている (Marschner *et al.* 2001, Wieland *et al.* 2001, Kuske *et al.* 2002)。根圏土壤微生物群は根からの多種多様な代謝分泌物の生化学的影響を受けており (Grayston *et al.* 1996, Merbach *et al.*), 遺伝子組換え植物の表現型の影響が現れやすいと考えられる。一方、現時点では根圏を越えた土壤 (バルク土壤) に遺伝子組換え植物の表現型が及ぼす影響の度合いについての詳細な報告はない。遺伝子組換え植物の栽培中及び栽培後のバルク土壤中の微生物群集への遺伝子組換え植物の影響についても知見を蓄積する必要がある。

根圏土壤微生物群集の構造解析に分別遠心を利用した根圏土壤からの微生物の分離が行われ、これまでに報告されている遺伝子組換え植物の土壤環境への影響評価にも用いられている (Lottmann *et al.* 2000, Heuer *et al.* 2002, Shmalenberger and Tebbe 2002)。このような操作は土壤粒子表層に存在する微生物群の分離には有効と思われるが、土壤粒子に強く吸着されている微生物細胞や、土壤粒子内部深くに生息する微生物群からの核酸の回収は不

可能である。さらに、抽出細胞画分に対して数度にわたる洗浄操作が加えられる場合も多く、微生物群ごとの細胞構造の脆弱性の違いによって抽出操作自体が検出される微生物群集へのバイアスとなり得る。したがって、多種多様な土壌微生物群の一部についてのみ基礎的な生理生態学的知見が得られている現状では、土壌からの核酸の分離分析のためには土壌に核酸抽出試薬を直接作用させる核酸抽出法が望ましい。実際、近年の核酸抽出操作技術の向上により、分別遠心を用いて調製した土壌微生物細胞からの核酸の間接的抽出法よりも直接的抽出法が分子生態学的解析に好ましいことがバルク土壌を用いた研究で報告されている (Holben *et al.* 1988, Steffen *et al.* 1988, Leff *et al.* 1995)。

植物体に関係するもう一つの問題として、サンプリングの際の植物の生育ステージについても考慮する必要がある。播種あるいは定植から一定期間後に根圏の微生物群集が形成されるが、生殖成長期以降は根系の大幅な老化が広く認められるので、老化期のサンプルから得られるデータの解析には注意する必要がある (Baudoin *et al.* 2002)。また、非組換え植物と組換え植物の間で土壌微生物群集構造に差異が認められる場合には、微生物群集構造に関して遺伝子組換え植物の栽培期間中のみでなく、連作や後作の他の作物栽培への影響を考慮した年単位の長期試験設計についての検討も必要となろう (Smalla *et al.* 2001)。

サンプリング後の注意点として DNA 抽出までの間の土壌サンプルの輸送・保存条件がある。試料採取時の微生物群の群集構造をできるだけ反映した核酸サンプルを抽出するためには、培養する場合と同様、土壌サンプルの採取直後に核酸抽出を行なうのが原理的には望ましい。それが不可能な場合には速やかに凍結保存する必要がある。RNA 分子は一般的に環境の影響を受けやすいことが知られており、微生物細胞から RNA 抽出を行う場合には、抽出までの適切なサンプル保存が特に重要である。

DNA 抽出の場合でも、環境変化により引き起こされる細胞壁成分の変化により DNA の抽出効率が変化することが純粋培養の実験系ではよく知られている (Yamada and Komagata 1970)。実際に核酸抽出用の土壌サンプルを 4°C で保存している例が見受けられるが、土壌サンプルの保存温度による各種微生物群の生態学的な安定性や核酸の抽出効率に及ぼす影響などの要因を考慮した保存条件を検討すべきである。

## 核酸抽出法

現在までに、土壌からの核酸抽出法そのものに関する原著論文だけで数十を超える報告がなされている。しかし、土壌の多様性を考えた場合には現在考案されている各種核酸抽出操作法 (Kuske *et al.* 1998, Miller *et al.* 1999, Hurt *et al.* 2001, Roose-Amsaleg *et al.* 2001, Gabor *et al.*

2003) に加えて各自の試料と研究目的に適した改変を経験的に検討する必要がある (表 1)。解析の対象となる核酸は DNA と RNA に分けられるが、実際に土壌微生物の群集構造の解析を報告している論文 123 報について調べた結果、約 90% の論文で DNA のみを解析対象としていた。一般的に土壌中で代謝活性の高いと考えられる微生物群の検出には、RNA の解析が有効である。しかしながら、RNA は化学的にも生物学的にも不安定な物質であることから、環境中の土壌サンプルから良質の RNA を分離精製することは DNA の分離精製よりも困難である。さらに、現在の核酸多型解析の基盤である PCR 反応では、反応基質としては DNA が必要である。そして、RNA から DNA への逆転写反応には化学的に純度の高い良質な RNA サンプルが必要とされる。これらの要求に応え得る RNA 抽出法としては、ハイドロキシアパタイトを用いる方法や超遠心分離を用いたリボソーム画分からのリボソーム RNA 調製法があるが、後者では比較的高額な機器 (超遠心機) の使用が必要となる (Felske 1996)。

DNA 抽出についても、幅広い種類の土壌から安定して抽出可能な方法は確立しておらず、研究対象の土壌毎に抽出条件の検討がなされている。このような状況の中でも最も広く利用されている抽出法は、Qbiogene 社製の土壌用 DNA 抽出キット (FastDNA SPIN Kit (for Soil)) であった。このキットを利用すれば、短時間 (1 サンプルの場合 1 時間以内) で PCR による増幅が可能な DNA を調製でき、過去 2 年間の調査した論文 40 報の内、16 報はこのキットを利用したものである。他に 6 報で使用されている新規の DNA 抽出キット (Ultra Clean Soil DNA isolation kit, Mol Bio Laboratories 社製) を加えると半数以上の報告例で市販キットによる DNA 抽出が行われていた。市販キット以外では Smalla らの方法 (Smalla *et al.* 1993, van Elsas and Smalla 1995) が DNA 抽出法として比較的多く採用されていたが、キットの利用頻度を上回るものではなかった。今後も簡易性に優れた DNA 抽出キットの多用が予想されるが、市販の全ての核酸精製キットはグアニジンチオシアネート等のカオトロピック試薬存

表 1. 土壌からの核酸抽出に用いられる主な操作

細胞破碎	ガラスビーズ法, 酵素処理法, 凍結融解法, 超音波法
緩衝液	Tris, SPB*, Tris-SPB
変性剤	グアニジン塩酸塩
界面活性剤	SDS, サルコシン酸, CTAB
有機溶媒抽出	フェノール, クロロフォルム
塩析	燐酸カリウム, 塩化セシウム, 酢酸アンモニウム
抽出キット	Ultra Clean Soil DNA kit (Mol Bio Laboratories Inc.)
	FastDNA SPIN Kit (for Soil) (Qbiogene)

\*Sodium Phosphate Buffer

在下において核酸をシリカに吸着させるという共通原理を使用しており、土壌のような物理化学的な特性についての多様性が高い環境試料を対象として安定した核酸調製が常に可能であるという保障はない。実際に、DNA 回収の困難な土壌サンプルの場合には RNA やスキムミルクの添加などが推奨されているが (Kageyama *et al.* 2003, Takada-Hoshino and Matsumoto 2004), それらの添加にも関わらず全く DNA が回収不可能な土壌の存在を筆者らは経験している (Ikeda *et al.* 2004a)。したがって、キットとは抽出あるいは精製原理の異なる土壌からの核酸回収法の検討も重要と思われる。

土壌の物性の違いや多種多様な細胞構造を持つ各種微生物群が存在する土壌からの核酸抽出では使用する核酸抽出法の違いにより分析結果も変動することはよく知られた事実である (Kresk and Weillington 1999, Martin-Laurent *et al.* 2001, Niemi *et al.* 2001)。多くの土壌微生物研究機関で用いられつつある核酸抽出法キットのマニュアルでは、各種微生物細胞からの DNA 抽出が可能と説明されている。しかし、これまでに他の抽出方法との比較試験に関する詳細な報告例は少なく (Martin-Laurent *et al.* 2001, Niemi *et al.* 2001), 現時点では、キットの常用に先立って対象の微生物群に対する抽出効率への影響を検討する必要があると思われる。

核酸抽出の最後の問題として、日本国内に広く分布する火山灰土の特性の影響が指摘されている (Takada-Hoshino and Matsumoto 2004)。筆者らが今回調査した結果、各主要雑誌において掲載された土壌微生物の群集構造変化を分子生態学的に解析している論文 123 報中、わが国の土壌を対象とした報告論文は見られなかった (表 2)。筆者らのグループにおいてもキットを含め海外で報告された抽出法数種について検討した結果、改變しない場合は核酸の回収が全く不可能あるいは著しく純度の低い DNA しか得られなかった (Ikeda *et al.* 2004a)。さらに日本では、複雑な地形の国土に異なる物性をもつ土壌が数多く存在することから核酸抽出法には今後も検討を加える必要があると思われる。

## PCR増幅

現在の核酸多型解析法の多くは、PCR による遺伝子増幅を基礎にしており、土壌からの核酸抽出法同様、サンプルの性質などに応じて反応液組成や反応条件の検討を行う必要がある。解析対象となる生物種や使用するプライマーの違いに由来するような一般的な注意に加えて、特に土壌から抽出された核酸を鋳型として PCR 増幅を行う場合は核酸と共に土壌から抽出されてくる PCR 阻害物質の存在を前提として PCR 条件を検討する必要がある。これに対する最も一般的で簡単な対処法は、PCR 反応阻害物質の阻害効果が見られない濃度まで鋳型 DNA の濃度を希釈することである。通常の PCR のように標

的核酸分子種が単一分子種の場合は、この鋳型 DNA 濃度を希釈する操作は増幅産物の解析結果に何ら影響しないと考えられる。しかし、多様な微生物群に由来し、かつ各微生物種の土壌中での存在比が不確定な土壌からの核酸を鋳型とする PCR では、希釈操作自体がある微生物種に関する解析結果に影響を与える可能性がある。天然環境から抽出された核酸の PCR 増幅に対する阻害物質の実体としては一般的に腐食質が指摘されており (Tsai and Olson 1992, Tebbe and Vahjen 1993, Wilson 1997), 鋳型核酸を腐食質から分離精製する方法が提案されている (表 3) (Berthelet *et al.* 1996, Miller 2002, Braid *et al.* 2003)。しかしながら、腐食質を除去した後も著しい PCR の阻害が観察される場合もあり、実際に今回調査した多くの論文では PCR 増幅時には PCR 阻害物質の作用に対する緩和剤 (表 4) が添加されている。

広範な土壌微生物の群集構造を分子生態学的に解析する際には、多様な微生物群に共通した塩基配列に対する

表 2. 論文数でみた地域および国ごとの核酸抽出及びリボソーム RNA 遺伝子多型解析による土壌微生物相分析

地域	報文数 *	国	報文数 *
アジア	0 (0.0%)		
アフリカ	0 (0.0%)		
オセアニア	3 (2.4%)	オーストラリア	2
		ニュージーランド	1
ヨーロッパ	83 (67.4%)	ドイツ	32
		オランダ	18
		連合王国	9
		フランス	8
		デンマーク	6
		ノルウェー	4
		オーストリア	2
		ベルギー	1
		イタリア	1
		スイス	1
		フィンランド	1
北アメリカ	36 (29.2%)	アメリカ	32
		カナダ	4
南アメリカ	1 (0.8%)	ブラジル	1
合計			123

\*rDNA, rRNA, Soil をキーワードとして Agricola (National Agricultural Library, USA) 及びScirusを検索。

表 3. 土壌から得られる DNA 粗抽出液の精製法

PEG 沈殿法	PEG6000, PEG8000
電気泳動法	ゲル抽出
スピンカラム	Sephadex G-100 (PVPP), Sephadex G-200, Sepharose 4B, Sepharose CL-4B, Sepharose CL-6B, Microcon YM-100, PVPP
精製キット	Wizard total DNA cleanup system (Promega), Gene Clean Spin-kit (Qbiogene)

表 4. リボソーム RNA 遺伝子の PCR 増幅で考慮すべき因子

プライマー	特異性	細菌, 放線菌, 古細菌, 糸状菌, 真核生物
	増幅配列	SSU*, LSU**, SSU-LSU スペーサー領域
PCR 反応阻害緩和剤		T4 フェージ 32 蛋白, BSA
高 GC 含量鋳型 DNA のための PCR 反応促進剤		フォルムアミド, DMSO, グリセロール, Betaine (Epicentre), GC-Melt (Clontech)
Taq polymerase の種類		AmpliTaqDNA polymerase (ABI), Expand High Fidelity DNA polymerase (Boehringer)
PCR プログラムの修飾		ホットスタート PCR, タッチダウン PCR

\*Small Sub Unit, \*\*Large Sub Unit

プライマーを利用するのがよい。現在では、各微生物群内で高度保存領域と高度可変領域の存在が詳細に解析されているリボソーム RNA 遺伝子配列が、PCR のための標的配列として広く用いられている (Medlin *et al.* 1988, Mehling *et al.* 1995, Borneman and Hartin 2000)。リボソーム遺伝子はゲノム上のコピー数も多いため、他の遺伝子を用いるのに比べ感度の点でも有利である。

リボソーム RNA 遺伝子の中でも、特に小サブユニット・リボソーム RNA 遺伝子配列について、変異頻度と PCR 増幅に適当な遺伝子サイズを持つなどの理由から詳細な解析が進められており、この遺伝子領域に特化したデータベースも構築されている (Maidak *et al.* 1999, Maidak *et al.* 2000)。そのようなデータベースを利用して細菌、放線菌、古細菌、糸状菌等の各微生物群に対する選択的増幅を可能とするプライマーの検討も既になされている (Blackwood *et al.* 2003, Heuer *et al.* 1997, Lueders and Friedrich 2002, Smit *et al.* 1999)。ただし、これらのプライマーは、既知の配列に対してデザインされたものであり、土壌微生物の多様性を考慮すれば、特定分類群に対する特異性を保障するプライマーではないことに注意すべきである。

さらに、各微生物種により土壌中の存在比、標的配列の GC 含量、異なる標的配列間での同一プライマーに対するアニーリングの競合性などが大きく異なることが考えられる。これらの要因によって、同じプライマーを用いても、各微生物において増幅効率が大きく異なる可能性がある。即ち、PCR 増幅反応自体が、後の解析結果へのバイアスとなり得る。特に環境微生物の群集構造の解析のための標的遺伝子として広く用いられているリボソーム RNA 遺伝子は、一般的に GC 含量が高く、PCR 反応の標的遺伝子としては比較的取り扱いの難しい遺伝子である。これらの障害に対する対策の一つとして、できる限り幅広い範囲の GC 含量の標的配列を PCR 増幅するために、高 GC 含量の遺伝子配列の増幅に有効とされる添加剤の使用が考えられる (表 4)。

土壌からの核酸抽出物中には上記のように PCR 増幅の標的配列として多様な分子種が含まれる一方で、同一環境下に遺伝的に非常に類似した微生物群が存在する事も考えられる。遺伝子配列の類似した配列間では PCR 増

幅時に類似配列自体がミスプライミングの原因となる可能性があり、更に、PCR 自体がこの種のバイアスを増幅してしまう可能性がある。この問題に対しては、ホットスタート法およびタッチダウン法により PCR 反応初期におこるミスプライミングの条件を抑えるという対策が考えられる。

## 解析手法

分子生態学的な核酸多型解析手法として現在までに提案されている代表的な方法としては DGGE, SSCP, RISA, T-RFLP がある (図 1)。

### Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

変性剤の濃度勾配を持つポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行うことにより異なる配列を持つ PCR 増幅産物を分画する (Muyzer *et al.* 1993)。現在、土壌微生物群集の構造解析に最も広く利用されている。利点としては点突然変異の検出も可能であること、解析後の増幅産物のクローニング及び遺伝子配列の比較が容易であること等である。欠点としては、解析操作が複雑である、ゲルの核酸断片分離能が低い、解析対象となる PCR 産物のサイズが数百塩基対までに限定されることなどである。なお実験の原理上、DGGE や SSCP で得られる核酸多型については塩基配列からの多型パターンの推定が困難なため、得られた多型に関する種の推定には塩基配列の決定が必須となる。ゲルから回収された DNA を鋳型としたダイレクトシーケンス反応を試みる場合は法的な問題はないが、クローニングを必要とする場合には土壌由来の核酸を鋳型 DNA として用いることから実験の法的なリスクレベルに留意されたい (<http://www.bch.biodic.go.jp>)。

### Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

複数の配列を含む PCR 増幅産物を変性させて一本鎖とし、一本鎖 DNA 内で形成される立体構造の塩基配列による違いをアクリルアミドゲル中での移動度の違いとして多型解析する (Lee *et al.* 1996)。利点としては DGGE と同様に同一サイズであっても点突然変異の検出が可能

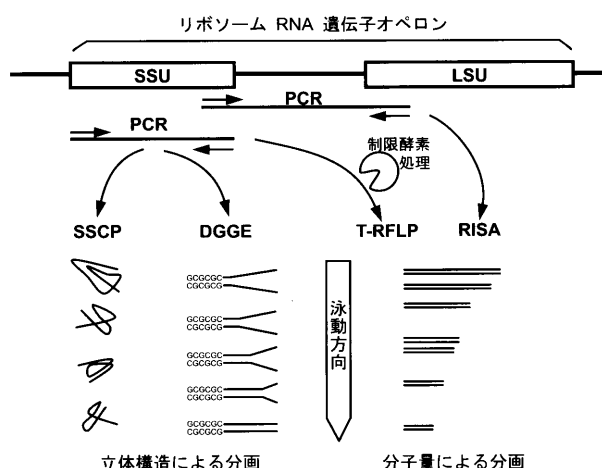


図 1. 微生物群集構造解析で用いられる主要な核酸多型解析法. SSCP, DGGE, T-RFLP, RISA のいずれの手法でも, リボソーム RNA 遺伝子オペロンを構成するスモールサブユニット RNA 遺伝子 (SSU) とラージサブユニット RNA 遺伝子 (LSU) の, 保存性の高い塩基配列をプライマー (逆向きの矢印対) に利用する. DGGE, SSCP, T-RFLP の場合は SSU を, RISA の場合は SSU と LSU の間の領域を PCR により増幅し, T-RFLP ではさらに PCR 産物を制限酵素処理する. 得られた PCR 産物を立体構造 (DGGE および SSCP の場合) あるいは分子量 (T-RFLP および RISA の場合) の違いにより分析する. SSCP では一本鎖 DNA を分析するが, DGGE では GC クランプと呼ばれる領域により一端が二本鎖のまま部分的に変性した DNA の分析を行う. ある変性剤濃度での変性の程度は塩基配列に依存するので, DGGE の泳動ゲル中の変性剤濃度勾配に従って塩基配列の異なる分子が分離される. 図ではある変性剤濃度での変性の程度の違いを模式的に示した. T-RFLP および RISA の場合は PCR 断片長による分析であり, 立体構造による分離に比べ再現性が高く, 異なるゲル間での結果の比較も容易である.

であること, 解析後の増幅産物のクローニング及び遺伝子配列の比較が容易であることなどである. 欠点としては, 1つの二本鎖 DNA から2つの一本鎖断片と相補鎖の再会合による都合3種類のバンドが得られるため多型解析結果が複雑になること, 解析対象となる PCR 産物のサイズが数百塩基対までに限定されることなどである.

### Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA)

リボソーム RNA 遺伝子オペロン中でスモールサブユニットとラージサブユニットの遺伝子間のスペーサー領域は微生物種間で配列や長さに違いが多いことが知られている. したがって, この領域を含むようにデザインされたプライマーを使用して得られた PCR 増幅産物を分画すれば各微生物種に由来する多型の検出が期待できる (Borneman and Tripplet 1997). 利点としては特別な機器を必要としないこと, アガロースゲルとポリアクリルアミドゲルの両方が利用可能なので解析対象となる PCR 産物のサイズが限定されないこと, 解析後の増幅産物のクローニング及び遺伝子配列の比較が容易であることなど

である. 欠点としては, 同一ゲノム中においてもリボソーム RNA 遺伝子オペロン間でスペーサー領域に多型を持つ微生物種が存在することなどである (Condon *et al.* 1995).

### Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

蛍光プライマーを使用して得られた PCR 産物を制限酵素処理し, 蛍光シーケンサーで蛍光ラベルされた制限酵素断片の多型長を解析する (Liu *et al.* 1997). 利点としては, 蛍光シーケンサーの利用により PCR 産物の高感度, 高解像度が期待できること, リボソーム・データベース・プロジェクト (Maidak *et al.* 1999, Maidak *et al.* 2000, Marsh *et al.* 2000) の利用により既知の微生物種のリボソーム RNA 遺伝子からの制限酵素断片長との比較が可能であること, オートメーション化による解析の迅速化が可能であること, 解析対象となる PCR 産物のサイズに制限がないこと等である. 欠点としては高額機器が必要であること, ランニングコストが高いこと, 検出された未知の配列に対する効率的なクローニング法がないこと等である.

土壌微生物群集の構造解析に関する最近の研究事例では, DGGE と T-RFLP が多用され, その他では, プライマーの蛍光ラベルにより蛍光検出を可能にした RISA の変法が若干使用されている (表 5). SSCP は現在ではあまり使用されていないが, 他の方法と多型の検出原理が異なることから, 他の多型検出法と共に補完的に利用する価値はあると思われる.

### 各手法間の比較

1回の PCR 反応当たりの多型の検出効率については多型 DNA の検出感度, 分解能等から T-RFLP が最も良い. 一方, RISA は技術的にも設備的にも負担が少なく, シーケンシングゲルと銀染色法の併用により多型の検出効率と分解能の向上も可能であることから, 今後の有望な方法となるとと思われる. RISA と T-RFLP の両方に共通する利点として解析対象とする PCR 産物のサイズに制限がない点が挙げられる. 即ち, DGGE や SSCP では解析可能な PCR 産物のサイズがプライマーの選択を制約する結果, 各微生物群に特異的なプライマーの選択が難しくなる. この問題を避けるために, DGGE による古細菌や放線菌の解析の場合には, Nested PCR が適用されている (Sandaa *et al.* 1999, Heuer *et al.* 1997). しかし, 異なるプライマーセットによる2度の PCR 反応により発生するバイアスの可能性については検討されていない. さらに, 解析手法の違いによる潜在的な問題点として, これまでに同一サンプルに対する各解析手法間での結果におけるバイアスの存在の有無については報告例がなく, バイアスの有無が確認されるまでは, 異なる解析手法間でのデータの比較については注意が必要と思われる.

表 5. 微生物群集構造解析に用いられる主要な核酸多型解析法の得失

	RISA	DGGE	SSCP	T-RFLP	塩基配列決定
報告数	53 (43%)	15 (12%)	8 (7%)	5 (4%)	42 (34%)
設備投資費	低	中	中	高	高
試薬経費	低	低	低	中	高
多型検出効率	低	中	中	中	高
解析時間	短	中	中	中	長
技術要求度	低	中	中	中-高	高
自動化	可	不可	可	可	可

現時点では上述したような各解析手法の利点と欠点を理解した上で、各自の研究目的、研究設備、研究予算に適した解析法を選択すべきである（表 5）。即ち、より多くの分類群を対象とする場合や、作業者の技量への依存性を下げて再現性を確保したい場合には T-RFLP や RISA が適当である。DGGE や SSCP には前述の様な制限があるものの、ごく近縁の種について一塩基突然変異のレベルでの多様性を検出する必要がある場合は検討に値する。

現在の解析手法に共通する問題点としては、いずれの解析法を利用しても一般的な土壌中の微生物多様性の全体の一部しか反映していないことが知られている（Murray *et al.* 1996, Lee *et al.* 1996）。最近開発されている土壌微生物のための他の多様性解析手段としては、定量 PCR 法（Bach *et al.* 2002, Martin-Laurent *et al.* 2003）とマイクロアレイ法（Small *et al.* 2001, Valinsky *et al.* 2002）が挙げられる。マイクロアレイ法の利点としては 1 回の実験当りの多様性検出効率が高いこと、多検体に対するハイスループット化が可能であることなどである。欠点としては、(i) マイクロアレイ法の原理自体が既知の遺伝子配列を対象としたものであるため難培養性の未記載生物は対象とできないこと、(ii) 現在の検出感度では土壌中の存在比の低い微生物種の解析が困難であること、(iii) 高額機器が必要であること、(iv) アレイ作成の負担が大きいこと等である。また、定量 PCR による微生物群集の動的構造解析は、微生物群集の種構成と同時に存在量についても情報をもたらす手法として検討され始めている。しかしながら、マイクロアレイ法、定量 PCR 法のいずれも現時点ではモデル実験にとどまっており、実際の土壌微生物の多様性解析に利用されるまでには至っていない。

### 核酸多型解析法を用いた遺伝子組換え植物の土壌微生物への環境影響評価

上述したような種々の核酸多型解析法を利用して、現在までに幾つかの遺伝子組換え植物で土壌微生物群集構造への環境影響評価が実際に検討されている。植物への遺伝子組換え技術の応用で最も期待されている目標の一つとして病害抵抗性植物の作出があるが、この場合に使

用される導入遺伝子には抗菌性蛋白などをコードし、幅広い微生物種への直接的な影響が懸念される遺伝子が多く使用されている。典型的な抗菌性蛋白の利用例として、細菌細胞壁溶解酵素であるリゾチームの遺伝子の導入により植物病原性細菌の侵入に対して抵抗性を示す遺伝子組換え作物の作出が考えられる（Düring *et al.* 1993, Mourgues *et al.* 1998）。一方、植物根の生理生態的影響が及ぶ根圏土壌には植物の生育促進や病害防除作用を持つ細菌の存在も知られており（Bashan and Holguin 1998）、これら有用細菌も抗菌性蛋白の影響を受ける可能性がある。Smalla らのグループは T4 ファージのリゾチーム遺伝子を導入したジャガイモが野外の圃場試験において微生物生態系へ与える影響について詳細な報告をしている（Heuer and Smalla 1999, Lottmann *et al.* 1999）。実際にリゾチーム遺伝子が導入された遺伝子組換え植物の根圏内での細菌群集構造が DGGE 法で野生型の植物と比較検討された結果、いずれの方法においても遺伝子組換え植物と非組換え植物の間での差異は検出されていない（Heuer *et al.* 2002）。

一方、遺伝子組換え植物の作出例で病害抵抗性と並んで多いのが除草剤抵抗性遺伝子の導入である。広く用いられている除草剤の一つであるグルホシネート系除草剤に対しては放線菌由来の除草剤分解遺伝子を利用した遺伝子組換えにより既に多くの除草剤耐性植物が作出・実用化されている。グルホシネート系除草剤は土壌中での分解が早く環境に対する負荷が低いと考えられている（British Crop Protection Council 2000）。遺伝子組換えにより作出されたグルホシネート系除草剤耐性のトウモロコシとナタネについて遺伝子組換え植物の土壌微生物への影響が検討されている。トウモロコシについては SSCP 法により検討した結果、組換え植物体と非組換え体の間で根圏微生物群集構造には差異は見られなかった（Schmalenberger and Tebbe 2002）。ナタネについては DGGE 法により検討された結果、組換え植物と非組換え植物の間で僅かながらも根圏土壌微生物の群集構造に差異が見られたが、生育ステージや除草剤散布などの環境要因のほうが微生物群集構造に与える影響ははるかに大きいことが示されたことから（Gyamfi *et al.* 2002）、この

ような遺伝子組換え植物の栽培が土壌環境に重大な影響を及ぼす可能性は非常に低いことが示唆された。また、遺伝子組換え植物において観察された微生物群集構造の差異を示すリボソーム RNA 遺伝子多型については塩基配列が決定されたが、動植物に対して有害性を示す細菌類との塩基配列上の類似性はなかった。上記の幾つかの報告論文において遺伝子組換え植物の土壌微生物への影響評価における核酸多型解析法の有用性が示されている。以上のように、遺伝子組換え体と非組換え体の間での土壌微生物群集構造の比較検討から、差がない場合や自然環境や植物の遺伝子型、生育段階に原因する微生物群集構造変化との比較において僅かな差である場合には遺伝子組換え植物が重大な影響を土壌微生物相に与える可能性は非常に低いと評価できる。また、差が見られる場合には、該当する多型に関する塩基配列情報を得ることにより動植物病原体との関連性を検討し、遺伝子組換え植物のさらなる安全性を担保することが可能となる。これまでのところ歴史的な流れから DGGE と SSCP が主に用いられていると思われるが、各手法間の比較のところでも説明したとおりこれらの方法は煩雑な操作、低い多型解像度、多型データ間の低い再現性などが問題点として指摘されている (Lukow *et al.* 2000, Schmalenberger and Tebbe 2003)。

現在、我々のグループでは、現在の微生物多様性解析で実際に広く利用されている各種核酸多型解析法を利用して、遺伝子組換え植物の土壌環境影響評価のための基礎データの作成を進めている。上述してきたように、現在の核酸多型解析法についても土壌微生物多様性をよりよく反映させるためには改良すべき幾つかの問題がある。植物を含めた遺伝子組換え生物の開放系での安全性評価法の確立を前提とした場合、環境微生物の群集構造に関する情報量をできるだけ減らさず、どこまで解析操作の簡易化が可能であるかが重要な課題である。このような目的のために現在、我々のグループでは日本国内の多様な土壌に対応可能な低コストの簡易 DNA 抽出法や、微生物群集構造の生態学的な解析を可能にする低コスト・大量解析に適した DNA 多型の簡易検出法などの方法論を確立しつつある (Ikeda *et al.* 2004b)。今後も土壌微生物多様性の全体像をよりよく反映する高効率かつ高感度な新規核酸多型解析法の確立と実用化のための低コスト化をさらに進めていく必要がある。

## 謝 辞

本総説は、学術振興会未来開拓研究推進事業「植物遺伝子」の「遺伝子解析を基盤とする植物多様性解析と安全性評価」(JSPS-RFTF97L00601) および文部科学省「21 世紀型革新的先端ライフサイエンス技術開発プロジェクト ライフサイエンス安全研究プログラム」の活動の一部として行った。

## 引用文献

- Ammann, R.I., W. Ludwig and K.-H. Schleiffer (1995) *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.
- Ammann, K. and Y. Jacot (2003) *In* “Methods for Risk assessment of Transgenic Plants IV Biodiversity and Biotechnology” Ammann, K. and R. Braun (eds.), Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, 19–33.
- Bach, H.-J., J. Tomanova, M. Schloter and J.C. Munch (2002) *J. Microbiol. Methods* 49: 235–245.
- Bashan, Y. and G. Holguin (1998) *Soil Biol. Biochem.* 30: 1225–1228.
- Baudoin, E., E. Benizri and A. Guckert (2002) *Appl. Soil Ecol.* 19: 135–145.
- Berthelet, M., L.G. Whyte and C.W. Greer (1996) *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 17–22.
- Blackwood, C.B., T. Marsh, S.-H. Kim and E.A. Paul (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 926–932.
- Borneman, J. and E.W. Triplett (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2647–2653.
- Borneman, J. and R.J. Hartin (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4356–4360.
- Braid, M.D., L.M. Daniels and C.L. Kitts (2003) *J. Microbiol. Methods* 52: 389–393.
- British Crop Protection Council (2000) *In* “Pesticide Manual” Surrey, UK.
- Cherry, J.R. and A. Fidantsef (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 438–443.
- Condon, C., C. Squires and C.L. Squires (1995) *Microbiol. Rev.* 59: 623–645.
- Daniell, H. (2002) *Nat. Biotechnol.* 20: 581–586.
- Düring, K., P. Porsch, M. Fladung and H. Lörz (1993) *Plant J.* 3: 587–598.
- European Commission (2001) *Official J. Europ. Communities* 17: 4.
- Felske, A., B.U. Engelen, U. Nübel and H. Backhaus (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4162–4167.
- Gabor, E.M., E.J. de Vries and D.B. Janssen (2003) *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 153–163.
- Grayston, S.J., S. Wang and C.D. Campbell (1996) *Appl. Soil Ecol.* 5: 29–56.
- Griffiths, R.I., A.S. Whiteley, A.G. O’Donnell and M.J. Bailey (2003) *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 35–43.
- Gyamfi, S., U. Pfeifer, M. Stierschneider and A. Sessitsch (2002) *FEMS Microbiol. Ecol.* 41: 181–190.
- Heuer, H., M. Kresk, P. Baker, K. Smalla and E.M.H. Wellington (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233–3241.
- Heuer, H. and K. Smalla (1999) *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 357–371.
- Heuer, H., R.M. Kroppenstedt, J. Lottmann, G. Berg and K. Smalla (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1325–1335.
- Holben, W.E., J.K. Jansson, B.K. Chelm and J.M. Tiedje (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 703–711.
- Hurt, R.A., X. Qiu, L. Wu, Y. Roh, A.V. Palumbo, J.M. Tiedje and J. Zhou (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4495–4503.
- Ikeda, S., K.N. Watanabe, K. Minamisawa and N. Ytow (2004a) *Microbes Environ.* In press.
- Ikeda, S., D.M. Roberts, K.N. Watanabe and N. Ytow (2004b) *J. Biosci. Bioeng.* 98: In press.
- James, C. (2003) *ISAAA Briefs* No. 30.
- Kageyama, K., T. Komatsu and H. Suga (2003) *J. Gen. Plant Pathol.*



- 69: 153–160.
- Kopeček, J. (2003) *Eur. J. Pharm. Sci.* 20: 1–16.
- Kresk, M. and E.M.H. Wellington (1999) *J. Microbiol. Methods* 39: 1–16.
- Kuske, C.R., K.L. Banton, D.L. Adorada, P.C. Stark, K.K. Hill and P.J. Jackson (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2463–2472.
- Kuske, C.R., L.O. Ticknor, M.E. Miller, J.M. Dunbar, J.A. Davis, S.M. Barns and J. Belnap (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1854–1863.
- Lechevalier, M.P., C. De Bievre and H. Lechevalier (1977) *Syst. Ecol.* 5: 249–260.
- Lee, D.-H., Y.-G. Zo and S.-J. Kim (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3112–3120.
- Leff, L.G., J.R. Dana, J.V. McArthur and L.J. Shimkets (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1140–1143.
- Liu, W.-H., T.L. Marsh, H. Cheng and L.J. Forney (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516–4522.
- Lottmann, J., H. Heuer, K. Smalla and G. Berg (1999) *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 365–377.
- Lottmann, J., H. Heuer, J. deVries, A. Mahn, K. Düring, W. Wackernagel, K. Smalla and G. Berg (2000) *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 41–49.
- Lueders, T. and M.W. Friedrich (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2484–2494.
- Lüdemann, H., I. Arth and W. Liesack (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 754–762.
- Lukow, T., F.P. Dunfield and W. Liesack (2000) *FEMS Microbiol. Ecol.* 32: 241–247.
- Maidak, B.L., J.R. Cole, C.T. Parker Jr., G.M. Garrity, N. Larsen, B. Li, T.G. Lilburn, M.J. McCaughey, G.J. Olsen, R. Overbeek, S. Pramanik, T.M. Schmidt, J.M. Tiedje and C.R. Woese (1999) *Nucleic Acids Res.* 27: 171–173.
- Maidak, B.L., J.R. Cole, T.G. Lilburn, C.T. Parker Jr., P.R. Saxman, J.M. Stredwick, G.M. Garrity, B. Li, G.J. Olsen, S. Pramanik, T.M. Schmidt and J.M. Tiedje (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 173–174.
- Marschner, P., C.-H. Yang, R. Lieberei and D.E. Crowley (2001) *Soil Biol. Biochem.* 33: 1437–1445.
- Marsh, T.L., P. Saxman, J. Cole and J. Tiedje (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3616–3620.
- Martin-Laurent, F., L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, J.C. Germon, G. Soulas and G. Catroux (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2354–2359.
- Martin-Laurent, F., S. Piutti, S. Hallet, I. Wagschal, L. Philippot, G. Catroux and G. Soulas (2003) *Pest Manag. Sci.* 59: 259–268.
- Medlin, L., H.J. Elwood, S. Stickel and M.L. Sogin (1988) *Gene* 71: 491–499.
- Mehling, A., U.F. Wehmeier and W. Piepersberg (1995) *Microbiol.* 141: 2139–2142.
- Merbach, W., E. Mirus, G. Knof, R. Remus, S. Ruppel, R. Russow, A. Gransee and J. Schulze (1999) *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162: 373–383.
- Miller, D.N., J.E. Bryant, E.L. Madsen and W.C. Ghiorse (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4715–4724.
- Miller, D.N. (2002) *J. Microbiol. Methods* 44: 49–58.
- Minnikin, D.E., A.G. O'Donnell, M. Goodfellow, G. Alderson, M. Athalye and J.H. Parlett (1984) *J. Microbiol. Methods* 2: 233–241.
- Mourgues, F., M.N. Brisset and E. Chevreau (1998) *Trends Biotechnol.* 16: 203–210.
- Murray, A.E., J.T. Hollibaugh and C. Orrego (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2676–2680.
- Muyzer, G., E.C. de Wall and A.G. Uitterlinden (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695–700.
- National Research Council (2002) *In* “Environmental Effects of Transgenic Plants” National Academy Press, Washington, D.C., 121–166.
- Niemi, R.M., I. Heiskanen, K. Wallenius and K. Lindström (2001) *J. Microbiol. Methods* 45: 155–165.
- Roose-Amsaleg, C.L., E. Garnier-Sillam and M. Harry (2001) *Appl. Soil Ecol.* 18: 47–60.
- Sandaa, R.-A., Ø. Enger and V. Torsvik (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3293–3297.
- Schmalenberger, A. and C.C. Tebbe (2002) *FEMS Microbiol. Ecol.* 40: 29–37.
- Schmalenberger, A. and C.C. Tebbe (2003) *Mol. Ecol.* 12: 251–262.
- Small, J., D.R. Call, F.J. Brockman, T.M. Straub and D.P. Chandler (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4708–4716.
- Smalla, K., N. Cresswell, L.C. Mendonça-Hagler, A. Wolters and J.D. van Elsas (1993) *J. Appl. Bacteriol.* 74: 78–85.
- Smalla, K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, A. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer and G. Berg (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4742–4751.
- Smit, E., P. Leeftang, B. Glandorf, J.D. van Elsas and K. Wernars (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2614–2621.
- Steffan, R.J., J. Goksoyr, A.K. Bej and R.M. Atlas (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2908–2915.
- Takada-Hoshino, Y. and N. Matsumoto (2004) *Microbes Environ.* 19: 13–19.
- Tebbe, C.C. and W. Vahjen (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2657–2665.
- Tsai, Y.L. and B.H. Olson (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2292–2295.
- Valinsky, L., G.D. Vedova, A.J. Scupham, S. Alvey, A. Figueroa, B. Yin, R.J. Hartin, M. Chrobak, D.E. Crowley, T. Jiang and J. Borneman (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3243–3250.
- Van Elsas, J.D. and K. Smalla (1995) *In* “Molecular Microbial Ecology Manual” KluwerAcademic Publishers, Netherlands 1.3.3 1–11.
- Walsh, G. (2003) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55: 3–10.
- 渡邊和男 (2000) *生物工学* 78: 23–26.
- 渡邊和男 (2001) *育種学研究* 3: 236–237.
- 渡邊和男・藤村達人 (2003) *育種学研究* 5: 195–197.
- Watanabe, K.N. (2003) *Nature* 421: 689.
- Wieland, G., R. Neumann and H. Backhaus (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5849–5854.
- Williams, M.E. (1995) *Trends Biotechnol.* 13: 344–349.
- Wilson, I.G. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3741–3751.
- Yamada, K. and K. Komagata (1970) *J. Gen. Appl. Microbiol.* 16: 215–224.