

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04899

研究課題名（和文）微生物による地球規模のリン循環メカニズムの解明

研究課題名（英文）Characterization of the microbial functions in global phosphorus cycling

研究代表者

廣田 隆一（Hirota, Ryuichi）

広島大学・統合生命科学研究科（先）・准教授

研究者番号：90452614

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、土壌や淡水圏においてリンの酸化および還元の生物学的変換を行う細菌群の包括的な解析を行い、特定の種属の細菌にその機能遺伝子が分布することを明らかにした。さらに、リン酸の還元、および亜リン酸/次亜リン酸の酸化によりリンの酸化還元状態の変換に関与する遺伝子、酵素群の同定を行い、分子レベルでの変換機構の解析を行った。リン還元経路については従来知られていない新規ホスホン酸合成経路の存在を示唆する知見を生化学的解析から得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の生物学の一般的な認識では、リンの生物循環において酸化還元状態の変化は介在せず、最も酸化された状態（酸化数+5）のリン化合物であるリン酸およびそのエステル化合物のみで循環すると考えられてきた。ところが、近年の研究で様々な微生物がリン酸を還元する活性を有する可能性が示唆され、リンの循環にはこれらの微生物の作用が非常に重要である可能性が考えられ始めている。本研究で明らかにした知見は、このメカニズムに関与する微生物群の存在を系統的に明らかにし、これらの微生物が有するリン代謝メカニズムの新しい知見を得た。この研究成果は、現在枯渇が懸念されているリン資源の有効利用にも貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed a comprehensive analysis of bacteria that contribute to the redox changes of phosphorus compounds in soil and freshwater environments. We revealed that the genes involved in the reduction and oxidation of phosphorus compounds, including phosphate, phosphite, phosphonates, and hypophosphite, are distributed in a specific phylogenetic group of bacteria. The genes involved in these conversions of the redox state of phosphorus compounds were identified, and their molecular mechanisms were analyzed. Our biochemical analysis revealed the presence of a novel pathway for the reduction of phosphate moiety of phosphate ester compound in the bacteria we identified.

研究分野：応用微生物学

キーワード：リン リン循環 亜リン酸 ホスホン酸 酸化還元 リン資源 バクテリア

## 1. 研究開始当初の背景

リンは窒素と共に生物の必須元素であり、その自然界における循環は生物・地球化学プロセスを経て生態系に大きな影響を及ぼす。窒素については、微生物による分子状窒素の固定（還元）とアンモニアの硝化（酸化）および脱窒が地球規模での循環に寄与する。他方、リンに関しては酸化還元状態の変化は起こりえず、最も酸化された形態であるリン酸（ $\text{PO}_4^{3-}$ ：リンの酸化数+V）の状態でのみ循環するものと考えられてきた。しかし、古くから環境中にホスフィン（ $\text{PH}_3$ ：リンの酸化数-）や次亜リン酸（ $\text{H}_2\text{PO}_2^-$ ：同+）、亜リン酸（ $\text{HPO}_3^{2-}$ ：同+）、炭素-リン結合を持つホスホン酸（ $\text{RPO}_3^{2-}$ ：同+）（以下、これらをまとめて“還元型リン化合物”と呼ぶ）が存在することや、細菌、古細菌の一部に還元型リン化合物をリン源として利用するものが環境中に広く存在することが知られていた。その一方で還元型リン化合物がどのように生成するのかということについてはほとんど明らかにされておらず、特に亜リン酸や次亜リン酸等の生成はリンの循環におけるミッシングリンクとなっていた。リンは一次生産者のバイオマス量変動を規定する因子でもあり、その循環は地球上の炭素循環にも大きな影響を及ぼす。従って、これまで酸化型のリン酸のみで論じられてきたリンの生物循環において、酸化還元がどれほどのインパクトを与えているかを明らかにすることは、地球化学的にも生物学的にも極めて重要な意味がある。

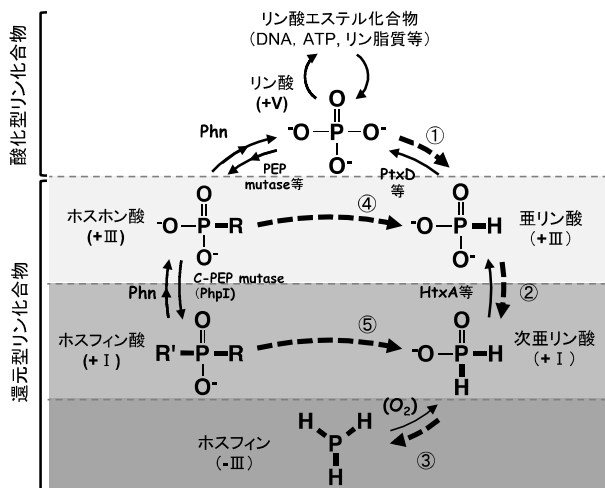


図1：リンの酸化還元サイクル  
 図上部から下部にかけて、リンの酸化還元状態が酸化側から還元側に変化している。ホスホエノールピルビン酸ムターゼ(PEP mutase)はリン酸エステル結合（Pの酸化数は+V）をC-P結合（Pの酸化数は+III）に変化させる。ホスフィン気体となって大気中へ放出される。化合物に記したローマ数字はリンの酸化数を表す。HtxA:次亜リン酸酸化酵素、PtxD:亜リン酸デヒドロゲナーゼ、Phn:C-Pリアーゼ、は還元型リン化合物の酸化機構の一部として知られるがこれら以外にも多様な酸化経路が存在する。①～⑥の点線はこれまで存在が示唆されているもの実証されていない経路（ミッシングリンク）。

## 2. 研究の目的

最近の研究によって、亜リン酸およびホスホン酸の酸化に関する酵素の単離や遺伝子が同定され、さらに、メタゲノムによるアプローチから、未培養ではあるが亜リン酸の酸化によって得られるエネルギーを増殖に利用するバクテリアの存在が示された。また、バクテリアの大規模ゲノム解析によって細菌や古細菌の多くにホスホン酸の生成を行う遺伝子が存在していることが明らかにされている。これらの事実は、還元型リン化合物の合成と代謝は微生物の一般的な機能ともいえるほど、多くの微生物にその能力が備わっているということを示唆するものである。しかしながら、これらの微生物が直接的なリン酸の還元をしているという知見は得られておらず、また他の経路についても詳細な代謝機構は不明な点が数多く残されている。本研究では、リンの生物循環に及ぼす酸化還元反応の全体像を明らかにするため、ミッシングリンクとなっている経路に関わる微生物の探索、および既知の経路に関わる分子機構の解明を行った。特に土壌、淡水圏に焦点を当て、リンの酸化と還元に関わる微生物の単離を行い、これらの微生物におけるリンの酸化と還元のメカニズムの解析および関連タンパク質の機能解析を行った。

## 3. 研究の方法

リンの酸化および還元について、無機還元型リン化合物の生成経路は不明であるが、複数のホスホン酸は放線菌から生成することが知られている。また、その生合成経路も一部明らかにされている。そこで、ホスホン酸を介した間接的な亜リン酸、次亜リン酸生成の可能性、およびリン酸からの直接還元による生成の2つの可能性を考慮したスクリーニングを行い、亜リン酸あるいは次亜リン酸を生成する微生物を単離した。また、還元型リン酸を利用する微生物についても既存の経路以外の酸化経路が存在することが考えられており、酸化経路の多様性を考慮したスクリーニングを実施した。得られたバクテリアについて、リン代謝に関する遺伝子を取得し、酵素活性およびリン基質選択性に関する生化学的データを取得し、その機能を解析した。これらにより、リンの酸化と還元の双方向から、自然界におけるリンの酸化還元反応における貢献を考察した。

### (1) ホスホン酸生成を介したリン還元微生物のスクリーニング

PepM(ホスホエノールピルビン酸ムターゼ)はホスホエノールピルビン酸とホスホノピルビン

酸の変換を触媒する酵素であり、ホスホン酸合成経路の初期反応を司る鍵酵素として知られている(図 2a)。米国イリノイ大学との共同研究により、PepM のコンセンサス配列をもとに作製した縮重プライマー(Fw: 5'-GCCBVTBVTYKTBGAYGGHGACACSGGR-3', Rv: 5'-CGGCVCGSAKTHKGTGRT TSGCSYARAT-3')を用いてスクリーニングを行い、およそ一万種のバクテリアおよび古細菌等から 253 種のホスホン酸合成能を有する微生物コレクションのデータベースを作製した。また、広島大学カルチャーコレクション(HUT)の菌株(83種)についてもスクリーニングを行った。さらにこの中から既知の経路以外のものを得るため、ユニークな骨格のホスホン酸(phosphonothrixin)を生じる放線菌として知られる *Saccharothrix* sp. の PepM 配列を用いて二次スクリーニングを行い、新規性が高い経路を有すると考えられる株の単離を行った。得られた株については、放線菌で一般的に用いられる複数の培地(R2AS, ISP4, GUBC, MMS, V8)を用いて培養を行い、7~10 日後の培養液を採取し、凍結乾燥後メタノール抽出し、<sup>31</sup>P NMR を用いて還元型リン化合物の生成を調べた。また、ゲノム情報をもとにした PepM 遺伝子周辺領域の解析を行った。

## (2) リン還元細菌のスクリーニング

リン酸からの直接的還元を行う微生物については、スクリーニング源として嫌気消化汚泥を用いた。Devai らは、生活排水処理の嫌気消化汚泥から、微量ではあるがホスフィンの生成があると報告しており、排水処理場における説明のつかないリン損失がこのホスフィンに由来すると報告している(Nature, 1998)。そこで、ガス検知管(ガステック)および GC-MS(GC: HP5890, MS: JMS-GCmate, カラム: Zebtron ZB-1)を用いて、嫌気消化汚泥(兵庫県排水処理場から採取)からのホスフィン検出を試みた。採取した汚泥 1 L をテドラーバッグに移し、良く混合した後、スペースのガスをシリンジで吸い、機器に供した。ホスフィンの標準物質としては、AIP(リン化アルミニウム)の水和により発生させた PH<sub>3</sub>を用いた。また、同じ嫌気消化汚泥を人工排水を含む嫌気バイアル中に 1%(v/v)入れ、窒素ガスでパージした後、28℃ でインキュベートし、経時的に嫌気培養系から発生するガスの解析を行い、ホスフィン発生微生物の存在を検証した。

## (3) 亜リン酸酸化細菌の収集と同定およびリン代謝関連酵素の機能解析

これまでに明らかにされている還元型リン化合物の酸化酵素として、亜リン酸デヒドロゲナーゼ(PtxD)、次亜リン酸酸化酵素(HtxA)炭素-リン(C-P)リアーゼ(Phn)が報告されている。亜リン酸輸送能が確認されている *Ralstonia* sp. 4506 由来 PtxD のアミノ酸配列をクエリにして、BLAST プログラムにより PtxD ホモログを有する細菌種を検索した。国内外の微生物株保存機関(ATCC、NBRC、JCM)から当該細菌株あるいはゲノム DNA を入手し、PCR 増幅した *ptxD* をプラスミドベクターにクローニングした。ゲノム DNA が入手できないものは、人工合成により遺伝子を作製した。これらを内在性リン酸輸送体を全て破壊した大腸菌 MT2012 株に形質転換し、0.5 mM 亜リン酸を唯一のリン源として含む MOPS 最少培地(MOPS リン酸および MOPS 亜リン酸培地)上での各種形質転換体の増殖速度により、導入した PtxD の機能を評価した。また機能性の PtxD 遺伝子については、大腸菌 pET システムを用いて組換えタンパク質を作製し、速度論的解析を行い、その生化学的性質を評価した。

## (4) 還元型リン化合物の酸化メカニズムの解明

リン酸および還元型リン化合物の代謝は、その細胞内輸送により開始されるため、輸送体による基質認識を把握することは極めて重要である。スクリーニングにより見出された亜リン酸酸化細菌、および次亜リン酸酸化細菌が有するリン化合物輸送体をクローニングした。アノテーションされていない場合は、亜リン酸酸化細菌 *Ralstonia* sp. 4506 株の PtxABC 遺伝子、および *Pseudomonas stutzeri* WM88 由来の HtxBCDE 遺伝子をクエリとして相同性検索により候補遺伝子を探索した。得られたプラスミドを HtxA(次亜リン酸オキシゲナーゼ)遺伝子および PtxD 遺伝子をあらかじめ導入した大腸菌 MT2012 株に導入し、リン酸、亜リン酸、次亜リン酸を唯一のリン源とした培地での増殖を調べることにより、各基質の利用能を調べた。培地中のリンの消費量はイオンクロマトグラフィー(DIONEX ICS-2000)で測定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ホスホン酸生成を介したリン還元微生物のスクリーニング

PEP mutase(PepM)は P(+V)から P(+III)の直接的な還元を担う酵素である。ユニークな構造のホスホン酸 phosphonothrixin を生成する *Saccharothrix* sp. ST-888 株の PepM をプローブとして放線菌のゲノムデータベース(Doroghazi, 2014 Nat. Chem. Biol.)に対して PCR によるスクリーニングを行った結果、280 種類の *pepM* 陽性株が得られた。また、広島大学放線菌カルチャーコレクション(HUT)からは、4 株の陽性株が得られた。さらに、これらの PepM 配列に対して tblastn 検索を行い、E-value < e-150 のスコアを示す PepM を有する株を 10 株取得した。<sup>31</sup>P NMR 解析により、このうち 5 株においてホスホン酸産生が認められ、実際に P(+III)生成を行っていることが確認された(図 2b)。また *pepM* クラスターの解析により、今回得られた 10 株は類似した遺伝子クラスターを有していた(図 2c)。さらに既知の還元ステップとは異なる反応系が存在することが示唆された。検出されたホスホン酸の同定は現在のところ行っていないが、NMR の結果から単一の株あたり複数種類(最大 6 種類)のホスホン酸が検出された。

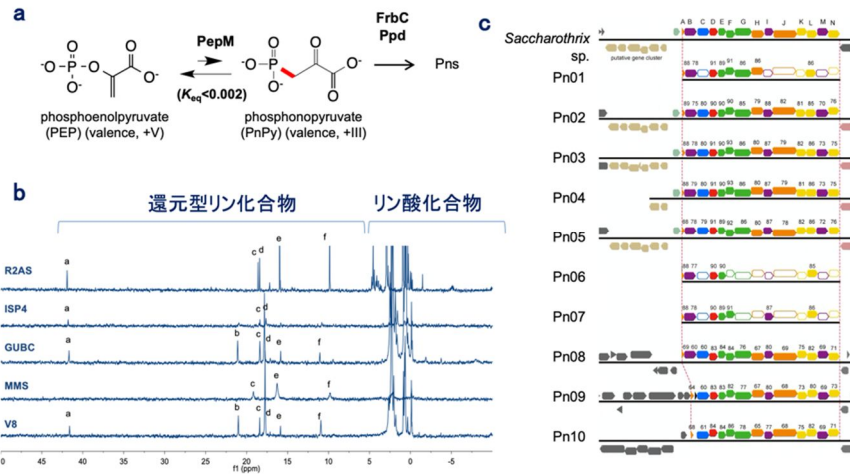


図2. ホスホン酸生成能を有する微生物のスクリーニング

a. PepM によるホスホノビルピル酸 (PnPy) 生成。PnPy は不安定であるが、続く反応により安定化した C-P 結合が生じる。b.  $^{31}\text{P}$ NMR を用いた Pn01 株におけるホスホン酸の生成。5 種類の培地中におけるホスホン酸生成量の比較例。c. PepM 陽性株の *pepM* クラスタ配列の比較

## (2) リン還元菌のスクリーニング

排水処理において、流入と流出リン量および生成汚泥中のリン量の収支が合わず、リンの損失が生じている事例の排水処理場（兵庫県）があり、ガス状還元型リン化合物であるホスフィンの発生が疑われた。そこで、同処理場から採取した汚泥についてガス検知管を用いて  $\text{PH}_3$  ガス測定を行ったところ、50~200ppm 程度存在することが示唆された。そこで、GC-MS により検出されたガスが  $\text{PH}_3$  であるか検証を行った。その結果、保持時間 185 min, 218 min にサンプルに由来したピークが検出された。これらのピークの MS チャートを解析した結果、分子量 34 のピークが検出されたが、検知管の結果から予測される量よりも大幅に少ない量であった。同排水処理場からは高濃度の硫化水素が検出されており、検知管も硫化水素を検出していた可能性が高いことから、偽陽性としてホスフィンを検出していたことが明らかとなった。また、汚泥の嫌気培養系においても 30 日を経過してもホスフィンは検出されなかった。このことから、当該試料に直接リン酸を還元してホスフィンを生成するリン還元菌が生息する可能性は低いと考えられた。

## (3) 亜リン酸酸化細菌の収集と同定およびリン代謝関連酵素の機能解析

当グループで取得していた亜リン酸酸化細菌 *Ralstonia* sp. の PtxD をクエリとして BLAST 検索を行った結果、グラム陰性の土壌細菌を中心として PtxD を有すると考えられる様々な細菌種が見出された。系統解析の結果から、*Ralstonia* の PtxD と異なるグループのホモログを有する 6 種の菌株（プロテオバクテリア門 2 種とシアノバクテリア門 4 種）を選択し、その *ptxD* 遺伝子をクローニングした（図 3）。これらのプラスミドを、MT2012 株に導入したところ、いずれのプラスミドを用いた場合も亜リン酸培地における増殖が確認された。このことから、全ての PtxD は機能的なものであることが明らかとなった。従来知られていた PtxD は亜リン酸を酸化する際の補酵素として主に NAD を利用する。今回の探索では、従属栄養細菌に比べて NADP 含量が高いシアノバクテリアにおいてもその分布が確認された。そこで、各種 PtxD を発現・精製し、その比活性および NAD/NADP 利用能を評価した。

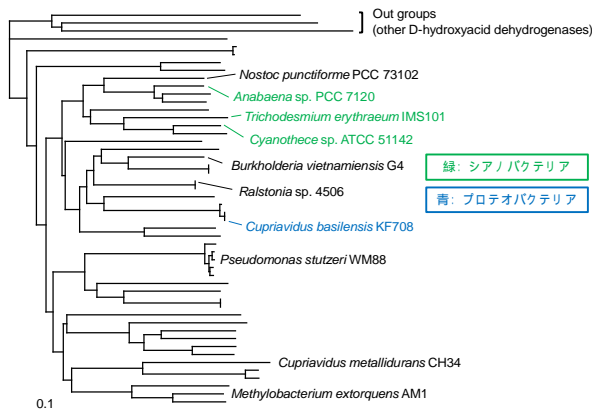


図3. PtxD ホモログの系統樹

Genome Net (Kyoto University Bioinformatics Center) の CLUSTALW および GeneDoc でアライメントを作成、TreeView を用いて描画した。色付き（青：プロテオバクテリア、緑：シアノバクテリア）は今回 *ptxD* のクローニングを行った細菌種。Out groups は上から順に *Hyphomicrobium methylororum* GM2, *Escherichia coli* MG1655, *Lactobacillus helveticus* DSM 20075 由来の D-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ。

その結果、従属栄養細菌由来 (Ral\_PtxD, Bv\_PtxD, Cth\_PtxD) のものでは NAD に対する活性が高く、NADP には低いという結果であった (Table1)。しかし、シアノバクテリア *Cyanothece* 由来 PtxD (Cth\_PtxD) では、NADP に対する高い活性を示し、 $k_{\text{cat}}/K_M$  が有意に高い値であった。野生型の PtxD で NADP に対する活性を示すものとしては、これは初めての例である。いずれの

PtxD も亜リン酸に対する  $K_M$  は約 70~120  $\mu\text{M}$  程度であった (Table1)。細胞内のリン濃度は通常 mM オーダーまで高まることが知られているため、亜リン酸資化において十分に機能しうると考えられる。

Table 1. 各種バクテリア由来 PtxD の酵素学的パラメーター

| Substrate               | Phosphite                          |                            |               | NAD                                |                            |               | NADP                               |                            |               |
|-------------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------|------------------------------------|----------------------------|---------------|------------------------------------|----------------------------|---------------|
|                         | $k_{cat}$<br>( $\text{min}^{-1}$ ) | $K_M$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $k_{cat}/K_M$ | $k_{cat}$<br>( $\text{min}^{-1}$ ) | $K_M$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $k_{cat}/K_M$ | $k_{cat}$<br>( $\text{min}^{-1}$ ) | $K_M$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $k_{cat}/K_M$ |
| <i>Ralstonia</i>        | 101                                | 87                         | 1.16          | 122                                | 12                         | 10.58         | 11                                 | 352                        | 0.03          |
| <i>Burkholderia</i>     | 144                                | 113                        | 1.27          | 185                                | 181                        | 1.02          | n.s.                               | n.s.                       | n.s.          |
| <i>Cupriavidus</i>      | 233                                | 90                         | 2.59          | 435                                | 251                        | 1.73          | n.s.                               | n.s.                       | n.s.          |
| <i>Anabaena</i><br>7120 | 100                                | 72                         | 1.39          | 104                                | 19                         | 5.50          | 285                                | 3693                       | 0.08          |
| <i>Cyanothece</i>       | 183                                | 119                        | 1.53          | 133                                | 46                         | 2.90          | 63                                 | 86                         | 0.73          |

n.s. not significant

#### (4) 還元型リン化合物の酸化メカニズムの解明

リンの細胞内への取り込みは輸送体を介して行われるが、リン酸、亜リン酸、次亜リン酸が輸送体タンパク質によりどのように区別されているかは不明である。PitA/B は低親和性、PstSCAB は高親和性の輸送体であることが知られている。大腸菌の Pst, Pit 輸送体について解析を行った結果、PstSCAB と PitB は、リン酸と亜リン酸を輸送することが可能であり、ほぼ同等の基質特異性を示すことがわかった。また、リン酸の輸送体として知られているものについては、次亜リン酸の輸送能は有していないことが明らかとなった。*Ralstonia* sp. の PtxABC は全てのリンを輸送することが可能であった。ptx オペロンはリン酸レギュロンの制御下にあることが知られているが、この結果は Ptx 遺伝子がリン酸獲得のために保持されている可能性を示唆するものであると思われる。また *P. stutzeri* WM88 由来 HtxBCDE は、他の輸送体とは異なり、リン酸に対する親和性を全く示さず、亜リン酸と次亜リン酸に特異性を示す、還元型リン化合物のみを輸送するリン輸送体であることが明らかとなった。*P. stutzeri* WM88 株の htx オペロンは phn オペロンと類似しており、ホスホン酸の輸送体から進化した可能性が考えられている。バクテリアにおいては、通常リン輸送体は複数存在する。これらが協調して機能するが、次亜リン酸、亜リン酸が基質として存在する場合の取り込みには、PtxABC や HtxBCDE など還元型リン化合物輸送体が有利であることが明らかとなった。

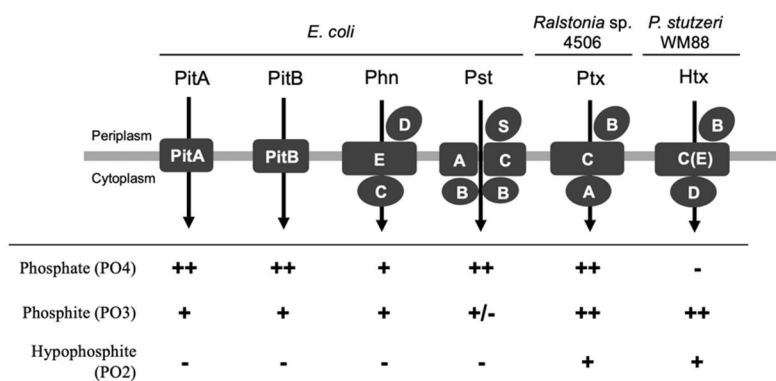


図4 . リン輸送体の基質特異性輸送体の模式図と各種輸送体によるリン酸、亜リン酸、次亜リン酸に対する親和性。- : 輸送能無し、-/+ : 弱い輸送能、+ : 輸送能あり。++ : 強い輸送能を示す。MT2012へ単独で発現させた場合の各種基質における増殖速度をもとに決定した。模式図はサブユニットの構造を示す。

#### (5) まとめ

本研究では、還元型リン化合物の代謝機能を有するバクテリアの単離と、それらが有するリン代謝機能の解析を行った。ホスホン酸は多様な種類が存在することが知られているが、本研究では、ホスホン酸の新規合成経路を有する放線菌群の存在が示唆された。また、亜リン酸デヒドロゲナーゼについては、水圏微生物である藍藻にも分布しており、種類によって NAD/NADP に対する補酵素選択性が異なること、リン輸送体についても同様に基質特異性が異なることが明らかにされた。この様に、本研究によってバクテリアにおける還元型リン化合物の代謝機構に関する知見を拡張することができた。今後、これらの成果を活用して、まだ明らかにされていないリンの生物循環の全体像が明らかにされることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Motomura Kei, Sano Kosuke, Watanabe Satoru, Kanbara Akihiro, Gamal Nasser Abdel-Hady, Ikeda Takeshi, Ishida Takenori, Funabashi Hisakage, Kuroda Akio, Hirota Ryuichi | 4. 巻<br>7                 |
| 2. 論文標題<br>Synthetic Phosphorus Metabolic Pathway for Biosafety and Contamination Management of Cyanobacterial Cultivation  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>ACS Synthetic Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>2189 ~ 2198 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acssynbio.8b00199   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Hirota Ryuichi, Motomura Kei, Kuroda Akio   | 4. 巻<br>なし                |
| 2. 論文標題<br>Biological Phosphite Oxidation and Its Application to Phosphorus Recycling   | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Phosphorus Recovery and Recycling   | 6. 最初と最後の頁<br>499 ~ 513   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/978-981-10-8031-9_34  | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>廣田隆一, 黒田章夫  | 4. 巻<br>68                |
| 2. 論文標題<br>亜リン酸を利用したロバストな微生物の培養と生物学的封じ込め  | 5. 発行年<br>2017年           |
| 3. 雑誌名<br>化学工業  | 6. 最初と最後の頁<br>41-47       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>廣田隆一, 黒田章夫  | 4. 巻<br>62                |
| 2. 論文標題<br>亜リン酸を利用した実用的な生物学的封じ込め手法  | 5. 発行年<br>2017年           |
| 3. 雑誌名<br>ケミカルエンジニアリング  | 6. 最初と最後の頁<br>28-34       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>廣田隆一, 黒田章夫                    | 4. 巻<br>55            |
| 2. 論文標題<br>亜リン酸デヒドロゲナーゼを利用した微生物の選択的培養技術 | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>化学と生物                         | 6. 最初と最後の頁<br>369-371 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし          | 査読の有無<br>無            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Hirota R, Abe K, Katsuura Z, Noguchi R, Moribe S, Motomura K, Ishida T, Alexandrov M, Funabashi H, Ikeda T and Kuroda A | 4. 巻<br>7           |
| 2. 論文標題<br>A novel biocontainment strategy makes bacterial growth and survival dependent on phosphite                             | 5. 発行年<br>2017年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>44748 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/srep44748   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 2件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一                                       |
| 2. 発表標題<br>亜リン酸を利用したバイオテクノロジー ~未利用リン資源の活用と新しいバイオ技術開発~ |
| 3. 学会等名<br>一般社団法人リン循環産業振興機構 第2回セミナー (招待講演)            |
| 4. 発表年<br>2019年                                       |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一                       |
| 2. 発表標題<br>リンの酸化状態変化に関する微生物とその代謝機構の解析 |
| 3. 学会等名<br>第1回リンと生命の起源研究会 (招待講演)      |
| 4. 発表年<br>2019年                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一                                    |
| 2. 発表標題<br>微細藻類の亜リン酸に対する資化能力の拡張と遺伝子組換え体の拡散防止措置への応用 |
| 3. 学会等名<br>植物の栄養研究会 第5回研究交流会（招待講演）                 |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一  |
| 2. 発表標題<br>組換え微生物第一種使用のための新しい生物学的封じ込め技術～微細藻類の例を中心に～                            |
| 3. 学会等名<br>新化学技術推進協会 ライフサイエンス技術部会 反応分科会講演会 「光合成生物利用への機能改変 - オープン/クローズ -」（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一   |
| 2. 発表標題<br>合成リン代謝経路の構築による生物学的封じ込め ～バイオセーフティー技術と組換え微生物第一種使用～ |
| 3. 学会等名<br>東京工業大学生命理工学院LiHub光合成科学研究グループシンポジウム（招待講演）         |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>廣田 隆一、三好 克樹、池田 丈、石田 丈典、舟橋 久景、黒田 章夫       |
| 2. 発表標題<br>バクテリアの還元型リン化合物輸送体HtxBCDEにおける基質認識メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名<br>第71回日本生物工学会大会                            |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |



|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>本村圭、廣田隆一、黒田章夫            |
| 2. 発表標題<br>亜リン酸を用いて遺伝子組換え生物を封じ込める方法 |
| 3. 学会等名<br>第2回広島大学コンパクトBRAVE（招待講演）  |
| 4. 発表年<br>2018年                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一                                      |
| 2. 発表標題<br>組換え藻類のバイオセーフティ技術開発 ～リン代謝経路の改変による生物学的封じ込め～ |
| 3. 学会等名<br>2018生態工学会年次大会（招待講演）                       |
| 4. 発表年<br>2018年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一                         |
| 2. 発表標題<br>安心・安全な遺伝子組換え微生物の利用を可能に！      |
| 3. 学会等名<br>イノベーション・ジャパン2018-大学見本市（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2018年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一                                |
| 2. 発表標題<br>リン代謝経路のデザインによる遺伝子組換え生物のバイオセーフティ技術開発 |
| 3. 学会等名<br>BioJapan2018（招待講演）                  |
| 4. 発表年<br>2018年                                |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>廣田 隆一                    |
| 2. 発表標題<br>遺伝子組換え微細藻類の安全な屋外培養のための研究 |
| 3. 学会等名<br>第70回バイオマスイブニングセミナー（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2018年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ryuichi Hirota   |
| 2. 発表標題<br>Engineering of Phosphorus Metabolic Pathway: A Safeguard Strategy for Greater Use of Genetically Modified Microorganisms |
| 3. 学会等名<br>Escherichia coli Systems Biology Workshop 2018（招待講演）（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀川 凌平, 本村 圭, 神原 亮大, 戸田 成美, 池田 丈, 石田 丈典, 舟橋 久景, 黒田 章夫, 廣田 隆一 |
| 2. 発表標題<br>海水培養が可能なシアノバクテリアへの亜リン酸資化能の付与                                |
| 3. 学会等名<br>第70回 日本生物工学会大会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>佐野 公亮, 本村 圭, 神原 亮大, 渡辺 智, 池田 丈, 石田 丈典, 舟橋 久景, 黒田 章夫, 廣田 隆一 |
| 2. 発表標題<br>亜リン酸依存性を利用したシアノバクテリアのバイオセーフティ技術                            |
| 3. 学会等名<br>第70回 日本生物工学会大会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>本村 圭, 神原 亮大, 堀川 凌平, 池田 丈, 石田 丈典, 舟橋 久景, 黒田 章夫, 廣田 隆一 |
| 2. 発表標題<br>藍藻由来亜リン酸デヒドロゲナーゼの酵素学的諸性質と選択培養技術への応用                  |
| 3. 学会等名<br>第70回 日本生物工学会大会                                       |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一, 池田丈, 荒川賢治, 黒田章夫     |
| 2. 発表標題<br>リンの酸化還元状態の変換に関する微生物の分布と解析 |
| 3. 学会等名<br>環境微生物系学会合同大会2017          |
| 4. 発表年<br>2017年                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>本村圭, 廣田 隆一, 佐野 公亮, 神原 亮大, 桂浦 善一朗, 堀川 凌平, 渡辺 智, 池田 丈, 石田 丈典, 舟橋 久景, 黒田 章夫 |
| 2. 発表標題<br>亜リン酸を利用したシアノバクテリアの新規生物学的封じ込め手法の開発  |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2018年度大会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>神原亮大, 廣田隆一, 池田丈, 舟橋久景, 黒田章夫 |
| 2. 発表標題<br>亜リン酸を用いたシアノバクテリアの選択的培養手法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第69回日本生物工学会                 |
| 4. 発表年<br>2017年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀川凌平, 神原亮大, 本村圭, 廣田隆一, 黒田章夫 |
| 2. 発表標題<br>亜リン酸を用いたシアノバクテリアの選択的培養手法の開発 |
| 3. 学会等名<br>藍藻の分子生物学2017                |
| 4. 発表年<br>2017年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ryuichi Hirota, Kei Motomura, Akio Kuroda  |
| 2. 発表標題<br>Engineering of Phosphorus Metabolic Pathway: A Safeguard Strategy for Greater Use of Genetically Modified Microorganisms |
| 3. 学会等名<br>The 9th International Symposium of Innovative Bioproduction Kobe (招待講演) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一, 池田丈, 黒田章夫                  |
| 2. 発表標題<br>バクテリアの還元型リン化合物代謝機能を活用したバイオテクノロジー |
| 3. 学会等名<br>環境バイオテクノロジー学会2016年度大会            |
| 4. 発表年<br>2016年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一, 黒田章夫                         |
| 2. 発表標題<br>亜リン酸を利用した新規生物学的封じ込め手法の開発           |
| 3. 学会等名<br>産総研中国センターシンポジウム～生命科学の革新的展開～ (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2017年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一                                   |
| 2. 発表標題<br>微生物の還元型リン化合物代謝とその応用 ~ 選択的培養と生物学的封じ込め ~ |
| 3. 学会等名<br>第11回日本ゲノム微生物学会年会大会 (招待講演)              |
| 4. 発表年<br>2017年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>桂浦善一朗、廣田隆一、舟橋久景、池田丈、黒田章夫     |
| 2. 発表標題<br>亜リン酸要求性大腸菌の生物学的封じ込め効果と増殖特性解析 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2017年度大会              |
| 4. 発表年<br>2017年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>廣田隆一、桂浦善一朗、野口麗次、森部重彬、舟橋久景、池田丈、黒田章夫 |
| 2. 発表標題<br>亜リン酸を用いた新規生物学的封じ込め手法               |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2017年度大会                    |
| 4. 発表年<br>2017年                               |

〔図書〕 計1件

|                |                 |
|----------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>廣田隆一 | 4. 発行年<br>2017年 |
| 2. 出版社<br>朝倉書店 | 5. 総ページ数<br>344 |
| 3. 書名<br>リンの辞典 |                 |

〔出願〕 計4件

|  |                  |               |
|--|------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>形質転換体、形質転換体の製造方法、および、当該形質転換体を用いた還元型リン化合物の有無の検出方法 | 発明者<br>廣田隆一、黒田章夫 | 権利者<br>広島大学   |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2016-170317                              | 出願年<br>2016年     | 国内・外国の別<br>国内 |

|  |                      |               |
|--|----------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>形質転換体、形質転換体の製造方法、および、当該形質転換体を用いた還元型リン化合物の有無の検出方法 | 発明者<br>廣田隆一、黒田章夫、本村圭 | 権利者<br>広島大学   |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2018-038036                              | 出願年<br>2018年         | 国内・外国の別<br>国内 |

|   |                                    |                             |
|---|------------------------------------|-----------------------------|
| 産業財産権の名称<br>TRANSFORMANT, METHOD FOR PRODUCING TRANSFORMANT, AND METHOD FOR DETECTING PRESENCE OR ABSENCE OF REDUCED PHOSPHORUS COMPOUND USING TRANSFORMANT | 発明者<br>Ryuichi Hirota, Akio Kuroda | 権利者<br>Hiroshima University |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、PCT/JP2017/027588   | 出願年<br>2017年                       | 国内・外国の別<br>外国               |

|   |                                    |                             |
|---|------------------------------------|-----------------------------|
| 産業財産権の名称<br>TRANSFORMANT, METHOD FOR PRODUCING TRANSFORMANT, AND METHOD FOR DETECTING PRESENCE OR ABSENCE OF REDUCED PHOSPHORUS COMPOUND USING TRANSFORMANT | 発明者<br>Ryuichi Hirota, Akio Kuroda | 権利者<br>Hiroshima University |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、PCT/JP2019/008137   | 出願年<br>2019年                       | 国内・外国の別<br>外国               |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 連携研究者 | 荒川 賢治<br><br>(Arakawa Kenji)<br><br>(80346527)      | 広島大学・統合生命科学研究科・准教授<br><br><br>(15401) |    |
| 連携研究者 | 中島田 豊<br><br>(Nakashimada Yutaka)<br><br>(10281164) | 広島大学・統合生命科学研究科・教授<br><br><br>(15401)  |    |