

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22337

研究課題名（和文）海洋微生物による化学的強固な亜リン酸化合物の選り好み利用を解明する

研究課題名（英文）Selective utilization of chemically-stable phosphonate by marine microorganisms

研究代表者

山口 晴生（Yamaguchi, Haruo）

高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・准教授

研究者番号：10432816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：

現代の海洋科学におけるリンとは、一般的に完全酸化型（V価）の正リン酸化合物のことを指す。一方で海洋には、還元型の亜リン酸化合物（Ⅲ価）が分布している。亜リン酸化合物の多くは、化学的に安定なC-P結合を有することから、海洋微生物にはほとんど利用されないと考えられていた。しかし、本研究課題の実施によって、亜リン酸化合物を利用可能な海洋微生物が多数見出された。また、供試された培養株は、正リン酸化合物を積極的に利用しながら亜リン酸化合物をも同時に利用（＝非選択に利用）できることが明らかとなった。これにより、海洋リン循環に対して微生物学的な亜リン酸化合物の分解が関与することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

あらゆる生命体の必須元素ゆえにリン（P）は全ての生命活動・生物生産を支配している。近年、海洋広域で見出された有機の亜リン酸化合物は、化学的には安定な類いゆえに、難分解性と認識されている。しかし今回の研究によって、当該化合物は多くの海洋微生物に利用されやすい、むしろ「生物学的には易分解性」であることが強く示唆された。水産の根底を支える海洋微生物の生理生態ならびに重要元素リンの循環機構に関する新知見を提供するとともに、新たな実験技術の有効性を実証できたことは、水産学ならびに関連分野の学術的進展に大いに貢献するものと判断される。

研究成果の概要（英文）：

Phosphonate (phosphonic acid) that possesses a carbon-phosphorus bond is a chemically stable form of organic phosphorus. Various phosphonic acids are widely distributed in oceanic waters; in particular, methylphosphonic acid (namely methylphosphonate) is believed to be responsible for global methane production. This study investigated the utilization of phosphonic acid compounds by cultures of marine bacteria. Marine bacterial cultures, especially belonging to Alpha-Proteobacteria, were able to grow on methylphosphonic acid as well as on the tested alkyl-, carboxy-, aminoalkyl-, and hydroxyalkyl-phosphonic acid compounds. Furthermore, our Phaeobacter cultures likely utilized phosphonic acid and phosphate compounds. These results suggest that marine bacteria, which exhibit varied utilization, are involved in microbial degradation of various phosphonic acid compounds.

研究分野：水圏微生物生態学

キーワード：亜リン酸 正リン酸 海洋微生物 細菌 培養 NMR 選択利用

1. 研究開始当初の背景

あらゆる生物の必須元素としてリンは重要であり、その中でカギ的役割を果たすのは一般的に完全酸化型の正リン酸化合物 (PO_4 態) とされている。そのような認識の下、近年、亜リン酸化合物 (PO_3 態) が海洋から見出されている (図 1)。当該化合物は海水に溶け込んでいるリン全体の 3 分の 1 を占めることがあり、量的に無視できるものではない。そのなかで“メチル亜リン酸”は (低濃度ながらも) 海洋全体に広く分布しており、その分解時に温室効果ガスの一つメタン (CH_4 : CO_2 の 2.5 倍の温暖効果) を生成する。このことは、リンで律速されがちな海洋生物生産機構、あるいは海洋メタンが関わる地球気候変動を理解する上で、メチル亜リン酸を含めた亜リン酸化合物の変動を解明することが極めて重要であることを意味している。

これを受けて海洋微生物による亜リン酸化合物の利用能が調べられるようになった。最近、一部の細菌種が亜リン酸化合物を唯一のリン源として利用できるとの報告が散見される。このことは海洋微生物による亜リン酸化合物の利用がリン循環に関わる可能性を示唆している。しかし海中では、亜リン酸化合物が正リン酸化合物と“混在”しているケースもあり、それらのなかで化学的に難分解なはずの亜リン酸化合物がどの微生物にどのように分解・利用されていくのかという「海洋微生物による亜リン酸化合物の分解・利用機作」については不明なままである。

この課題に取り組むにあたり、我々は次の新仮説を打ち立てた；海洋に広く分布する細菌群のなかには、正リン酸化合物と共にある亜リン酸化合物を選び好んで (選択的に) 分解・利用するものが存在しており、それらが亜リン酸化合物 (亜リン酸メチルなど) も起点となる海洋リン循環を駆動している。

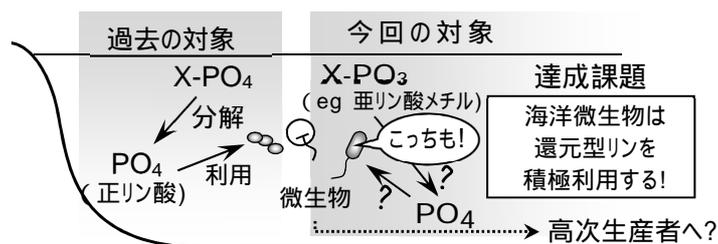


図 1 過去の研究対象と比較した今回の達成課題に関する概略図。
X は主に有機物を指す。

2. 研究の目的

この新しい仮説の検証を果たすため、本研究では、申請者らが考案した培養・分析技術を駆使することで、まず亜リン酸化合物を分解・利用可能な海洋微生物を探索しようとした。これらと先行確立した海洋偏在細菌株とあわせて、亜リン酸化合物の選択分解・利用を明らかにし、この機作を組み入れた海洋リン循環機構を新構築することを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

以下の小課題を設定・遂行することで研究の最終目的を達成しようとした。

3 - 1. 天然海水からの亜リン酸化合物利用細菌の分離ならびに培養株の確立

本邦沿岸域にて採取した海水試料を成分独自調製の培地に接種し、目的とする細菌の分離培養株を確立した。ここで得られた培養株の分子系統学的位置を明らかにすることで、亜リン酸化

化合物利用能を備えうる細菌群を明らかにしようとした。

3 - 2 . 分離培養株による亜リン酸化合物の分解・利用の評価(亜リン酸化合物が単独で存在)

多種多様な亜リン酸化合物(図2)を対象にした培養試験を実施した。各化合物それぞれを唯一リン源とする培地において供試株を培養し、細菌の細胞収量の指標となる吸光度(OD₆₆₀)を経時的に測定した。得られた吸光度ベースの細胞収量と増殖速度に基づいて、各化合物の分解・利用能について評価した。

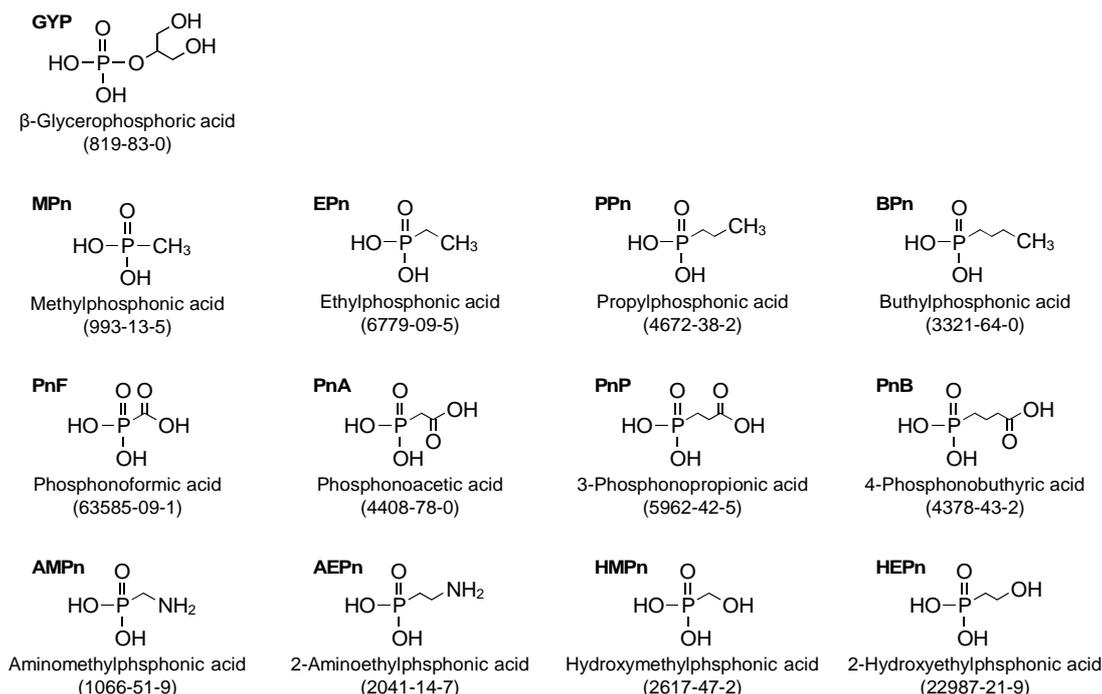


図2 供試リン化合物について。数値はCAS番号を示す。

3 - 3 . 分離培養株による亜リン酸化合物の分解・利用能の評価(亜リン酸化合物が他と混在)

前項において優れた分解・利用能を示した細菌培養株を対象に、正リン酸化合物と亜リン酸化合物が混在した条件下での培養試験を実施した。ここでは、核磁気共鳴をベースにした筆者らの新技術(Yamaguchi et al. *Phycol. Res.* 2022)を用いて、混在しているリン化合物の変動を網羅的かつ定量的に捉え、供した化合物いずれが優先的に(選択的に)利用されるのかを調べようとした。

3 - 4 . 生物情報科学的アプローチによる亜リン酸化合物分解細菌種とそれらの分布の解析

近年、データの蓄積が目ざましい海洋細菌のゲノムデータベースを対象に、亜リン酸化合物の分解に関わる遺伝子群の有無ならびに由来について、生物情報科学的なアプローチにより調べた。

4 . 研究成果

本研究により、亜リン酸化合物をリン源として分解・利用し、それに伴い増殖できる海洋細菌を多数分離することができた。その多くはAlpha-Proteobacteriaで占められており、なかには海洋遍在種と知られる*Phaeobacter*などが含まれていた。今回分離された海洋細菌いくつかの分解・利用能試験を調べたところ、供試した有機亜リン酸化合物(図2)のほとんどを利用し、正リン酸化合物(図2のGYP)を利用した場合と匹敵する程度まで、あるいはそれ以上に増殖可

能なことが示された(図3)。なお、ギ酸亜リン酸(図2のPnA)については、酸化の度合いが大きい——酸化分解の余地がほぼ無い——ために、細菌に分解・利用されないことが推察された。

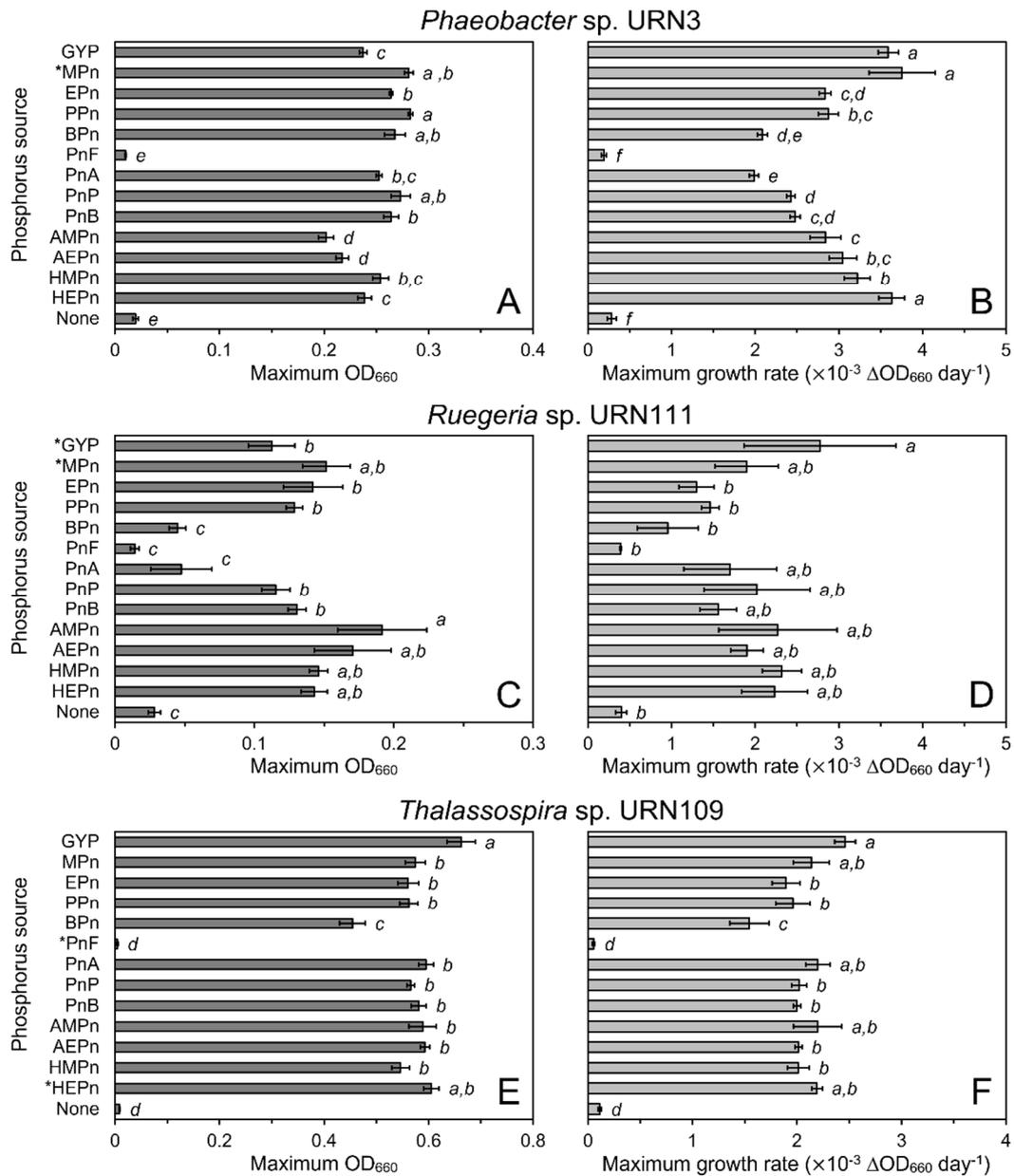


図3 供試海洋細菌 *Phaeobacter*, *Ruegeria* および *Thalassospira* 培養株の最大細胞収量 (OD₆₆₀) (A, C, E) ならびに最大増速度 (B, D, F) に基づいて評価されるリン化合物分解・利用能。多重比較解析に基づいた最大細胞収量の有意差 (p < 0.05) はアルファベットの不同で示されている。

正リン酸・亜リン酸化合物が混在する条件下において、供試した細菌は化合物いずれもほぼ同時に利用することが明らかとなった。有機亜リン酸化合物は C-P 結合を備えているため化学的に安定であり、そのままの形では加水分解作用を受けない。したがって細菌による当該化合物の利用においては、おそらく C-P 結合の切断、それに伴う正リン酸の遊離、その遊離正リン酸と元ある正リン酸の非選択的な同化、これらが同時に進行していると考えられる。

生物情報科学的なアプローチによっても新たな知見が得られた。すなわち、Alpha-

Proteobacteria 目に属する海洋細菌の多くは、亜リン酸化合物の分解・利用に欠かせない遺伝子群 *phn* シリーズを備えていた。このことを裏付けるように、*phn* シリーズを有する細菌と同種もしくは近縁種の分離培養株は、ほぼ例外なく亜リン酸化合物を利用できることが、少なくとも属レベルで判明した。また、近年蓄積が進むメタゲノムデータを解析することで、*phn* シリーズを有する細菌が海洋に広く分布していることも強く示唆された。

現時点における知見として、海洋にはメチル亜リン酸、酢酸亜リン酸、ヒドロキシメチル亜リン酸、2-ヒドロキシエチル亜リン酸ならびにヒドロキシプロピル亜リン酸が分布していると考えられている。これらを含めた多種多様な有機亜リン酸化合物を、本試験に供試した海洋細菌はほとんどすべて利用可能なことが明らかになった。本邦沿岸由来の供試細菌のいくつかは海洋偏在細菌グループに属していることを考えると、それらの細菌が海域における有機亜リン酸化合物の分解に深く関わる可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Shinpei Urata, Yuki Kurosawa, Naoto Yamasaki, Hirofumi Yamamoto, Nagatoshi Nishiwaki, Yuki Hongo, Masao Adachi, Haruo Yamaguchi	4. 巻 369
2. 論文標題 Utilization of phosphonic acid compounds by marine bacteria of the genera <i>Phaeobacter</i> , <i>Ruegeria</i> , and <i>Thalassospira</i> (-Proteobacteria)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnac065	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浦田真平, 山本博文, 山崎直人, 西脇永敏, 足立真佐雄, 山口晴生
2. 発表標題 海洋細菌 <i>Phaeobacter</i> sp. 培養株のホスホネート利用能
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口晴生
2. 発表標題 魚貝類を斃死させる赤潮現象の解明に向けて
3. 学会等名 高知大学研究拠点プロジェクト「革新的な水・バイオマス循環システムの構築」2020年度公開シンポジウム「海の恵みを楽しむために」Teamsオンライン
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦田真平, 山下春菜, 山本博文, 山崎直人, 西脇永敏, 足立真佐雄, 山口晴生
2. 発表標題 本邦沿岸域より分離された海洋細菌の有機亜リン酸化合物利用能
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦田真平, 山下春菜, 黒澤悠輝, 足立真佐雄, 山口晴生
2. 発表標題 有機亜リン酸化合物を利用可能な海洋細菌の分離と諸性状解析
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒澤悠輝, 浦田真平, 山下春奈, 足立真佐雄, 山口晴生
2. 発表標題 化学的に安定なホスホネートを利用可能な海洋細菌の探索
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浦田真平, 岩井健人, 西脇永敏, 足立真佐雄, 山口晴生
2. 発表標題 リン源混在下における海洋細菌のホスホネート化合物利用機作
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 還元型無機リン酸の選択的酸化方法および測定方法	発明者 山口晴生, 浦田真平	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-103797	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

水族環境学研究室（赤潮，魚毒性中毒・貝毒，珪藻ウイルス，海洋リン循環，バイオ燃料）
<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~yharuo/laques/index.html>
(2023年6月報告時点)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西脇 永敏 (Nishiwaki Nagatoshi) (30237763)	高知工科大学・環境理工学群・教授 (26402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------