

耐熱性亜リン酸デヒドロゲナーゼの発見と応用

Discovery of a Thermostable Phosphite Dehydrogenase and Its Application

廣田 隆一*, 黒田 章夫
RYUICHI HIROTA and AKIO KURODA

広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻 〒739-8530 広島市鏡山一丁目3番1号

* TEL & FAX: 082-424-7047

* E-mail: hirota@hiroshima-u.ac.jp

Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530, Japan

キーワード: 亜リン酸, 耐熱性酵素, 補酵素再生系, 選択マーカー

Key words: Phosphite, thermostable enzyme, cofactor regeneration system, selection marker

(原稿受付 2014年7月1日/原稿受理 2014年7月8日)

1. はじめに

リンは全ての生物にとって必須の元素であり, 生物が利用するリンのほとんどがリン酸 (PO_4^{3-}) であることは周知の事実である。しかし, 様々な酸化状態のリンが存在し (図 1a), そしてそれらを利用するバクテリアが存在することはあまり知られていない。最近, 海洋環境における可溶性リンに占める還元型リン化合物 (ホスホン酸) の割合が 10–25% と, これまで考えられていた以上に多く存在することや^{3,13,21}, 大規模メタゲノム解析によってホスホン酸の生成源となり得る微生物が環境中に広く分布していることが明らかにされるなど^{17,22}, リンの生物循環における還元型リン化合物の役割が注目されつつある^{10,13}。また, 同時に還元型リン化合物の生成, 代謝に関わる酵素の分子レベルでの解析も急速に進んできている^{13,16}。

亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) は, 還元型リン化合物のひとつである亜リン酸 (HPO_3^{2-}) を酸化する酵素として 2001 年に発見された⁴。亜リン酸の環境中における動態は不明であり, PtxD の生理学的機能や PtxD をもつバクテリアの環境中での生態もほとんど分かっていないが, この非常に特徴的な酵素は工学的利用の観点からも興味深い。本稿では工学的利用を指向した耐熱性 PtxD の取得と, PtxD を利用した二つのバイオテクノロジーの可能性について紹介したい。

2. バイオプロセスにおける補酵素再生酵素としての利用

2.1 補酵素再生系と耐熱性 PtxD の取得

現在, 生体触媒は様々な工業プロセスにおいて利用されているが, 使用されている酵素の 65% は単純な反応を触媒する加水分解酵素である⁵。これに対し, 酸化還元酵素や転移酵素のような補酵素依存性の酵素は, より

複雑な反応が可能であるものの, NAD(P)H などの高価な補酵素の利用がネックとなり, 実際のプロセスで使用することが難しい。そのため, 酵素反応により安価な基質から補酵素を再生する補酵素再生系の利用が望まれる。現在利用されている NADH 再生酵素には, ギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH) や, グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) がある。しかしこれらの再生系は, 基質の安全性や再生酵素の比活性, 反応液の pH 変化をもたらす副反応物の生成などに問題を抱えている¹⁹。

PtxD は亜リン酸の酸化に伴って NADH を生成するため, NADH 再生系として利用できる (図 1b)。この反応の利点として, ①亜リン酸の価格は NADH の 1/1000 未満で非常に安価であること, ② NADH の生成と共役させてもほぼ不可逆に反応が進行し ($\Delta G^\circ = -63.3 \text{ kJ/mol}$) その自由エネルギー変化量は既存の NADH 再生酵素の中で最大であること, ③反応副産物であるリン酸は緩衝作用を持つため pH 変動による反応阻害が起こらないこと, ④再生反応の基質と生成物が無機物質であり, 有機廃液を出さないクリーンなシステムの構築が可能であることなどが挙げられる。しかし, 既存の PtxD は熱安定性に乏しく不安定であるという問題を抱えていた。Woodyer らはランダム変異によって *P. stutzeri* 由来の PtxD の熱安定性を, 60°C 以上に高めることに成功していたが, この変異体には熱安定性と引き替えに亜リン酸に対する特異性が低下しているうえに, 大腸菌で発現させると Inclusion body になりやすいという問題があった^{18,19}。

そこで, 我々は独自に熱安定性の高い PtxD の取得を試みた。様々な環境中の土壌を, 亜リン酸を唯一のリン源とする合成培地で集積培養し, 高温で増殖するバクテリアの取得を試みた。その結果, 45°C で旺盛に増殖する *Ralstonia sp.* 4506 株を得ることに成功した⁷。本菌は他の亜リン酸酸化細菌と比べ, 亜リン酸をリン源とした

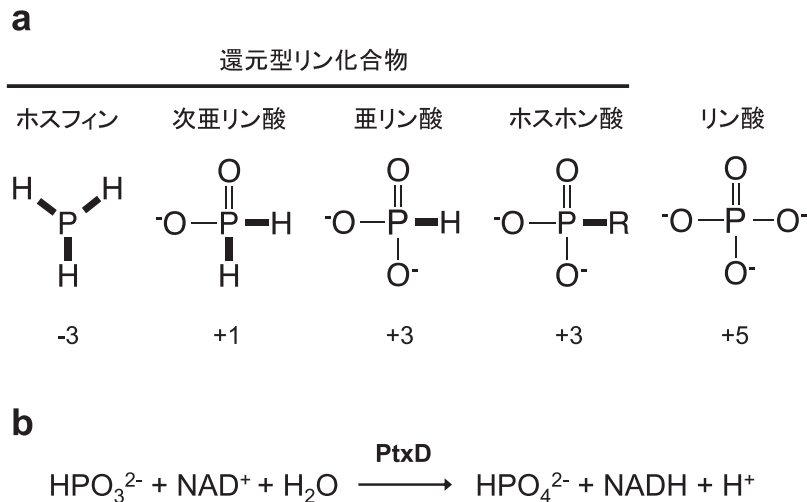


図1. 還元型リン化合物と PtxD による亜リン酸の酸化

a. 還元型リン化合物。化合物下に示した数値はリンの酸化数を表す。b. PtxD による亜リン酸の酸化反応

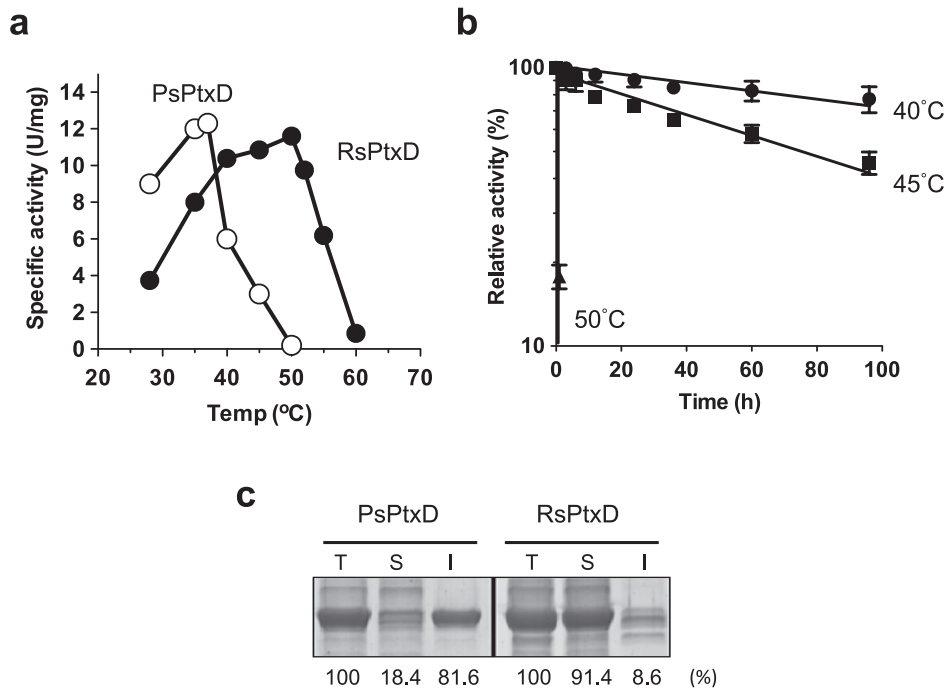


図2. RsPtxD の生化学的特徴

a. PtxD の反応至適温度。b. RsPtxD の熱安定性。RsPtxD を 40°C, 45°C, 50°C で保持した後の比活性の相対値をプロットした。c. PtxD 組換え大腸菌のタンパク質画分。T: 全タンパク質, S: 可溶性画分, I: 不溶性画分。写真の下の数字は全タンパク質の PtxD を 100% としたときの割合を示す。

場合の増殖速度が、リン酸をリン源とした場合とほとんど変わらず、効率的な亜リン酸酸化能力を有していることが示唆された。4506 株の PtxD (RsPtxD) を取得し、生化学的解析を行ったところ、反応至適温度は 45°C、45°C における半減期は 73 時間であり *P. stutzeri* の PtxD (PsPtxD) に対し、3,000 倍の熱安定性を示した (図 2a, b)。また、酵素活性も V_{\max}/K_m ベースで 6.7 倍以上の値を示し、発現したタンパク質の 90% 以上が可溶性タンパク質として発現していることがわかった (図 2c)。以上のことから、高い触媒効率、可溶性、熱安定

性を示す RsPtxD は、工学的利用に適した性質を有していることが分かった⁷⁾。

2.2 RsPtxD の基質特異性の改変

RsPtxD は NAD^+ は利用できるが、 NADP^+ に対してはほとんど活性を示さなかった。NADPH は NADH に比べてモル当たり 10 倍以上高価であり、NADPH 再生系の需要も非常に高い。そこで、RsPtxD の基質特異性の改変を試みた。これまで、数種類の NAD^+ 依存性デヒドロゲナーゼにおいてタンパク質立体構造が解明さ

れ、Rossmann-foldと呼ばれるNAD⁺結合部位のβ2位シート構造とα3位ヘリックス構造の中間に位置するアスパラギン酸残基、あるいはその近傍に塩基性アミノ酸置換を導入することで、NADP⁺への特異性が高まることが知られている¹¹⁾。RsPtxDにおいても同等の機能を持つと考えられるアスパラギン酸残基(D175)が存在したため、D175をアラニンへ、隣接する176位のプロリンをアルギニンへ置換した変異体(RsPtxD-DM)を作製した。得られたタンパク質の速度論的解析を行ったところ、RsPtxD-DMはK_mが野生株に比べて大きく低下し、NADP⁺に対する特異性が高まっていることが明らかになった。また、V_{max}は大きく上昇しており、V_{max}/K_m値で比較すると野生型と比べて触媒活性が約170倍も上昇していることが明らかになった。

2.3 RsPtxDを使ったNAD(P)H再生系の有効性評価

次にRsPtxDを使ったNADH再生系、およびRsPtxD-DMを使ったNADPH再生系の有効性評価を行った。抗ウイルス薬の前駆体として使用されるL-tert-ロイシン(LTL)は、ロイシンデヒドロゲナーゼ(LeuDh)によるNADH依存的な立体選択的還元のアミノ化によって合成することができる(図3a)。そこで、RsPtxDを用いたNADH再生系をこの反応と共役させて、LTL合成を行った。0.5 mMのNAD⁺を使った反応系において

50 mMのトリメチルピルビン酸を3時間で全てLTLに変換できた(図3c)。次にRsPtxD-DMによるNADPH再生系の評価を行った。*Thermus thermophilus*由来のシキミ酸デヒドロゲナーゼ(TtSDH)のシキミ酸合成反応(図3b)とRsPtxD-DMの共役反応を、10 mM 3-デヒドロシキミ酸(3-DH)、0.2 mM NADP⁺存在下で行った。その結果、50分で反応が完結し、全ての3-DHをシキミ酸に変換することが出来た(図3d)。

この様に、RsPtxDを用いたNADH再生系、RsPtxD-DMを用いたNADPH再生系は、共に有効である事が明らかになった。また、両反応系共に45°Cで反応を行っており、RsPtxDの高い熱安定性がこの温度条件での反応を可能としている。現在利用されているNAD(P)H再生酵素では、酵素自体の比活性が高い事から、GDHが最も好まれて使われているようである。しかし、RsPtxDを用いたNAD(P)H再生系も、前述のメリットがあることから、今後NAD(P)H再生系の選択肢のひとつとして利用されていくことが期待される。

3. 抗生物質を使用しない安全で安価な選択マーカーとしての利用

3.1 大規模培養における選択的培養の問題

さて、もう一つのPtxDの利用例に話を移したい。近

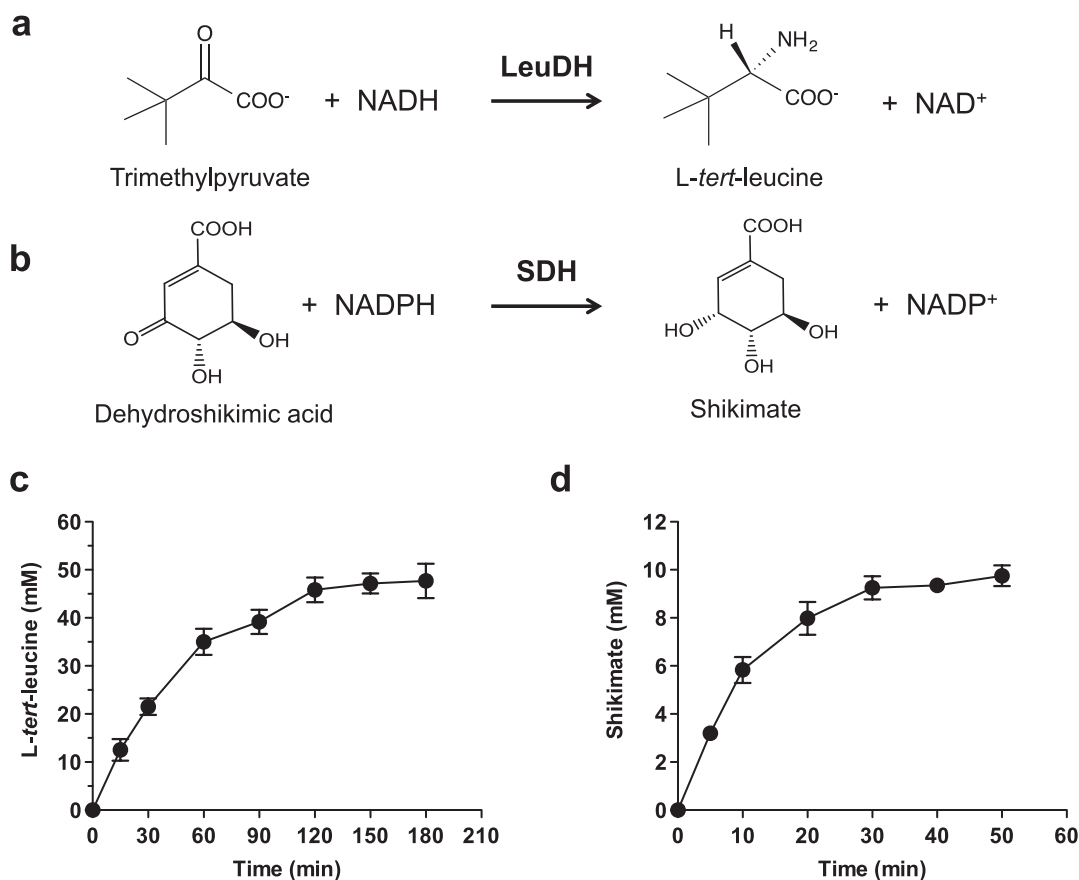


図3. RsPtxDによるNAD(P)H再生系を使用した物質生産

a, b. ロイシンデヒドロゲナーゼによるL-tert-leucine合成とシキミ酸デヒドロゲナーゼによるL-tert-leucine合成。c. RsPtxDによるNADH再生系とロイシンデヒドロゲナーゼの共役反応によるL-tert-leucine合成。d. RsPtxD-DMによるNADPH再生系とシキミ酸デヒドロゲナーゼの共役反応によるシキミ酸合成

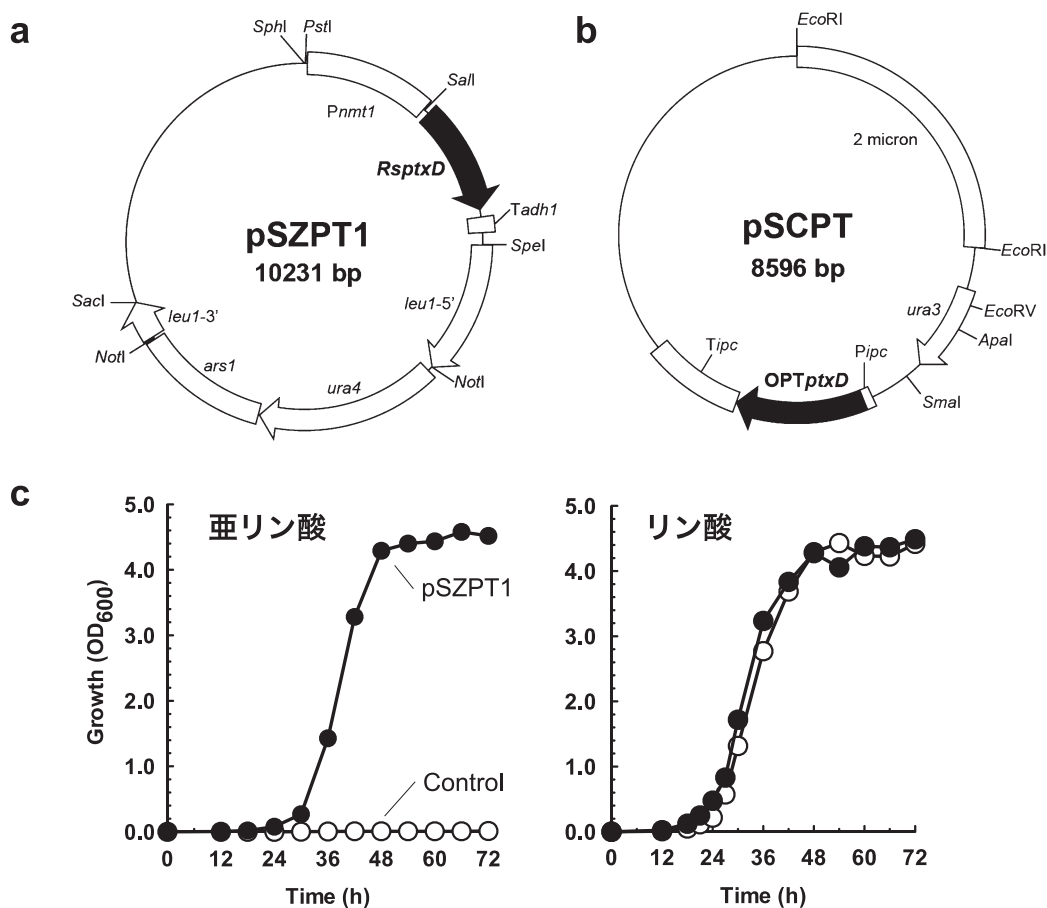


図4. 酵母における PtxD の選択マーカーとしての利用
 a. 分裂酵母用の形質転換プラスミド pSZPT1. b. 出芽酵母用の形質転換プラスミド pSCPT. c. pSZPT1 を *Sz. pombe* に導入した株の亜リン酸合成培地における増殖 (左) とリン酸合成培地 (右) の増殖。コントロールは RspTxD が挿入されていないプラスミドを導入した株。

年のバイオ技術の進展により、再生バイオ燃料や化成品など様々な物質を合成する微生物が開発されるようになってきた。この次に期待されるのは、これらの技術が実用化されることであろう。使用する微生物や目的生産物によって多少の違いはあるものの、一般的に実用レベルで行われる培養の規模は、実験室で扱われるレベルとは大きく異なり、時には数千キロリットルスケールの巨大なものとなる。この規模で行われる培養は、実験室で行われる培養とは大きく異なり、以下の点を考慮に入れるなければならない。まず、培地と装置の滅菌である。実験室では採算性など考えずフィルター濾過やオートクレーブ滅菌が可能であるが、巨大な装置装置で行うには相当のエネルギー (= コスト) が必要となるし、培養規模によっては現実的では無い場合もある。次に、抗生物質の利用である。実験室では抗生物質を用いて目的の遺伝子組換え体のみを培養することが可能であるが、大規模培養では抗生物質そのもののコストに加え、抗生物質を含む廃液を環境中に漏出させてしまうと、耐性菌の出現を促してしまうという衛生管理上の問題がある。そのため、廃液や残渣中の抗生物質を適切に処理するためのコストも必要である。つまり、有用微生物を使った物質生産の実用化は、選択的培養を達成すればよいだけでなく、投入コストを上回る生産性プラス安全

性を満たす事が前提であり、そのような培養プロセスが構築できなければ、いくら有用な微生物であっても実用化する事は難しい。

実際のバイオペラントで行われている培養は、ケースバイケースのようである。バイオエタノール生産の様に特に規模が大きい場合は、コストがかかるため原料を減菌しないケースがほとんどである。しかし、雑菌の繁殖により生産性が大きく低下することから、米国のバイオエタノールプラントでは約半数が抗生物質を使用している²¹⁵⁾。一方、医薬品関連原料を作るプロセスなど、抗生物質の混入が禁忌となる場合は、廃液の問題以外にもダウンストリームにおいて抗生物質の混入をチェックしたり除去するプロセスが必要になることから、抗生物質を使用しないで培養を行うことが多い。しかし、この場合は原料や装置の滅菌はもちろん、運転中も厳重な無菌操作が必要となる。そこで、安全でコストのかからない培養技術があれば、バイオ技術の実用化のハードルを大きく下げることができる可能性がある。

3.2 PtxD を選択マーカーとした選択的培養

選択マーカーは遺伝子工学の重要なツールの一つであり、一般には抗生物質耐性遺伝子や、栄養要求性変異株の要求性を相補する遺伝子などが選択マーカーとして用

いられる。ほとんどの生物は亜リン酸を利用することができないため、PtxD を目的の微生物に導入し、亜リン酸を唯一のリン源とする培地で培養すれば、目的微生物のみを選択的に増殖させることができる。つまり、*ptxD* が選択マーカーとして利用できると考えられる。亜リン酸は植物の肥料として認可されており安全性は問題無く、前述したように価格は非常に安く、リン酸とほぼ変わらないレベルである。また、亜リン酸が完全に消費されるように培養系に添加すれば、リン酸による排水処理の負荷もほとんど無くなる。そこで PtxD が実際に選択マーカーとして利用できるか、産業上重要な微生物である酵母と大腸菌においてその有効性を検証した。

3.2.1 酵母における利用

酵母は、真核生物の重要なモデル微生物として研究に使用されているだけでなく、バイオ燃料や化成品、医薬品中間体を生産する微生物宿主として用いられている。単倍体の実験室酵母については、さまざまな選択マーカーが存在する。特に *Ura*, *His*, *Leu* などに代表される栄養要求性マーカーは、特定の化合物を必要とせず培地の組成を変えるだけで利用できることから、利便性が非常に高い。しかし、栄養要求性マーカーの利用は、栄養要求性変異株の取得が前提であり、多倍体の実用酵母では非常に困難である⁹⁾。変異株の取得は理屈上不可能ではないが、染色体の数に応じて目的の変異株が得られる確率は指数的に減少するうえ、仮に変異株が取得できたとしても目的外の変異が多数導入され、本来の表現型が失われることもある。この様な場合、形質転換体をポジティブにスクリーニングすることができる「ドミナント選択型」の選択マーカーが望まれるが、その多くは薬剤耐性遺伝子であり大量培養で使うには不向きである¹⁾。

出芽酵母として *S. cerevisiae* Kyokai No-6, -7, -9, Shochu SH-4 (実用酵母, 多倍体), *S. cerevisiae* W303a (実験室酵母, 単倍体), 分裂酵母として, *Shizosaccharomyces pombe* (単倍体) の亜リン酸利用能を調べたところ、全て亜リン酸をリン源として利用できないことが確認された⁹⁾。そこで、RsPtxD をマルチコピーベクターに導入したプラスミド (pSZPT1 : 図 4a) を作製し, *S. pombe* に導入したところ、亜リン酸を単一のリン源とした合成培地で増殖し、最終到達菌体量はリン酸をリン源としたときとほぼ変わらないことが確認された⁹⁾ (図 4c, d)。また、合成培地プレート上における形質転換体の選択効率も、栄養要求性マーカーを利用した場合と遜色ないことが確認された他、染色体に導入して単一コピーでの選択も可能であるなど、非常に利便性の高い選択マーカーとして利用できることが確認された⁹⁾。一方、*S. cerevisiae* においては、野生型 RsPtxD は機能せず、亜リン酸資化能を付与することはできなかった。この原因を調べたところコドン使用頻度に起因することが示唆されたため、コドンを *S. cerevisiae* に最適化した遺伝子 (OPT_{PtxD}) を合成し、マルチコピープラスミドに挿入した。このプラスミド pSCPT (図 4b) を上記 5 種の出芽酵母に導入したところ、形質転換株に顕著な亜リン酸酸化活性が認められ、亜リン酸合成培地上で増殖することができた。合成培地プレート上における直接選択の効率も栄養要求性マーカーとほぼ変わらず、形質転換の選択マーカーとして有効であった⁹⁾。しかしながら、液体培養における最

終到達菌体量がリン酸使用時の 30% 程度であり、より多くの菌体収量を得る目的で PtxD を利用する場合は、この問題を解決する必要がある。*S. cerevisiae* の培養液に亜リン酸を添加すると増殖が遅くなることが認められていることから、PtxD の発現量をさらに高め、取り込まれた亜リン酸の酸化速度を上げることが必要なかもしれない。

3.2.2 大腸菌における利用

大腸菌は言うまでもなく、バイオテクノロジーにおいて最も利用される事の多いバクテリアのひとつであり、様々な生物に由来する遺伝子の異種発現系の宿主として利用されている。大腸菌には PtxD 以外にも亜リン酸の酸化経路が 2 種類存在することが知られている。一つは C-P リアーゼによる酸化経路 (Phn 経路) であり、もう一つはアルカリホスファターゼ (PhoA) による経路である。前者は、ホスホン酸 (図 1) を代謝する 11 個の遺伝子からなる非常に複雑な反応で構成されており⁸⁾、亜リン酸もこの経路で酸化されると考えられている¹⁴⁾。後者は、大腸菌の PhoA にのみ存在し、他の生物のアルカリホスファターゼにこの活性は見られない。また、その活性は PtxD に比べると 100-1000 倍以上低い²⁰⁾。

大腸菌において PtxD をマーカーとして利用するには、これらの内在性の亜リン酸酸化活性が存在しても、選択性を維持できるかどうか評価する必要がある。RsPtxD を亜リン酸トランスポーターである *ptxABC* と共に pUC ベクターにクローニングし、大腸菌 MG1655 株に導入した株を作製し、この株と PtxD を持たない野生株を競合させて 0.5 mM の亜リン酸を含む合成培地で培養を行い、培養終了時の両者の割合を測定した。その結果、培養開始時に PtxD 導入株と同量 (10^6 cells), 50 倍 (5×10^7 cells) の野生株が競合株として共存しても培養終了時 (80 時間後) には PtxD 導入株が 99.7%, 97.0% の割合を占めることが分かった。これは、大腸菌の内在性の亜リン酸酸化活性に対し、PtxD 導入株の活性が強いということを反映した結果であると考えられる。今後、分子改変などにより PtxD の活性を高めることなどで、より選択性を高めることができると考えている。

3.3 PtxD マーカーの今後の課題と展望

現在のところ酵母と大腸菌以外の生物では、藻類 (*Synechococcus elongatus*), 植物 (シロイヌナズナ) において NAD⁺ 依存型の PtxD が機能することを確認している¹²⁾。これらの生物種における効果をみると、PtxD が異種宿主で機能するためには PtxD タンパク質の発現量が重要な要素の一つであるが、それに加えて宿主そのものの亜リン酸に対する感受性や亜リン酸の細胞内への取り込みも関係しているようである。今後、様々な生物において PtxD を広く利用するには、これらの関係を明確にする必要があると考えられる。また、使用する培地について触れておくと、上記実験で使用した PtxD 導入大腸菌は、培地を滅菌しなくてもコンタミが起こることはほとんどなかった。よって、このシステムを使えば原料を未滅菌で使用するような大規模培養においても、抗生物質を利用しないで選択圧を与える培養が可能であると考えられる。

4. おわりに

以上, PtxD を使った2つのバイオ技術を紹介させていただいた。リンは生命現象に深く関わっていることから, リン化合物やリン代謝に関わる酵素には, 非常に有用な機能を有するものが存在し, 利用次第では面白い技術を作り出せる可能性がある。これまであまり注目されていなかった還元型リンの世界には, まだ興味深い生命現象が存在する。これらを利用した新たな技術が生まれることを期待したい。

文 献

- 1) Akada, R., Y. Shimizu, Y. Matsushita, M. Kawahata, H. Hoshida, and Y. Nishizawa. 2002. Use of a YAP1 overexpression cassette conferring specific resistance to cerulenin and cycloheximide as an efficient selectable marker in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19: 17–28.
- 2) Bischoff, K.M., S.Q. Liu, T.D. Leathers, R.E. Worthington, and J.O. Rich. 2009. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 103: 117–122.
- 3) Clark, L.L., E.D. Ingall, and R. Benner. 1998. Marine phosphorus is selectively remineralized. *Nature* 393: 426–426.
- 4) Costas, A.M., A.K. White, and W.W. Metcalf. 2001. Purification and characterization of a novel phosphorus-oxidizing enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88. *J. Biol. Chem.* 276: 17429–17436.
- 5) Faber, K. 2004. *Biotransformations in organic chemistry*, 5th edition, Springer.
- 6) Hashimoto, S., M. Ogura, K. Aritomi, H. Hoshida, Y. Nishizawa, and R. Akada. 2005. Isolation of auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 312–319.
- 7) Hirota, R., S.T. Yamane, T. Fujibuchi, K. Motomura, T. Ishida, T. Ikeda, and A. Kuroda. 2012. Isolation and characterization of a soluble and thermostable phosphite dehydrogenase from *Ralstonia* sp. strain 4506. *J. Biosci. Bioeng.* 113: 445–450.
- 8) Kamat, S.S., H.J. Williams, and F.M. Raushel. 2011. Intermediates in the transformation of phosphonates to phosphate by bacteria. *Nature*. 480: 570–573.
- 9) Kanda, K., T. Ishida, R. Hirota, S. Ono, K. Motomura, T. Ikeda, K. Kitamura, and A. Kuroda. 2014. Application of a phosphite dehydrogenase gene as a novel dominant selection marker for yeasts. *J. Biotechnol.* 182–183: 68–73.
- 10) Karl, D.M. 2014. Microbially mediated transformations of phosphorus in the sea: new views of an old cycle. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 6: 279–337.
- 11) Katzberg, M., N. Skorupa-Parachin, M.F. Gorwa-Grauslund, and M. Bertau. 2010. Engineering cofactor preference of ketone reducing biocatalysts: A mutagenesis study on a gamma-diketone reductase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* serving as an example. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 1735–1758.
- 12) Kuroda, A. and R. Hirota. 2014. Environmental biotechnology for efficient utilization of industrial phosphite waste. *Global Environ. Res.* in press.
- 13) McGrath, J.W., J.P. Chin, and J.P. Quinn. 2013. Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 412–419.
- 14) Metcalf, W.W. and B.L. Wanner. 1991. Involvement of the *Escherichia coli phn (psiD)* gene cluster in assimilation of phosphorus in the form of phosphonates, phosphite, Pi esters, and Pi. *J. Bacteriol.* 173: 587–600.
- 15) Olmstead, J. 2012. Bugs in the system: How the FDA fails to regulate antibiotics in ethanol production. Institute for Agriculture and Trade Policy (USA) Library Documents.
- 16) Peck, S.C. and W.A. van der Donk. 2013. Phosphonate biosynthesis and catabolism: a treasure trove of unusual enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17: 580–588.
- 17) Villarreal-Chiu, J.F., J.P. Quinn, and J.W. McGrath. 2012. The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Front Microbiol.* 3: 19.
- 18) Woodyer, R., W.A. van der Donk, and H. Zhao. 2006. Optimizing a biocatalyst for improved NAD(P)H regeneration: directed evolution of phosphite dehydrogenase. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 9: 237–245.
- 19) Woodyer, R., H. Zhao, and W.A. van der Donk. 2005. Mechanistic investigation of a highly active phosphite dehydrogenase mutant and its application for NADPH regeneration. *FEBS J.* 272: 3816–3827.
- 20) Yang, K. and W.W. Metcalf. 2004. A new activity for an old enzyme: *Escherichia coli* bacterial alkaline phosphatase is a phosphite-dependent hydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 7919–7924.
- 21) Young, C.L. and E.D. Ingall. 2010. Marine dissolved organic phosphorus composition: Insights from samples recovered using combined electrodialysis/reverse osmosis. *Aquat. Geochem.* 16: 563–574.
- 22) Yu, X., J.R. Doroghazi, S.C. Janga, J.K. Zhang, B. Circello, B.M. Griffin, D.P. Labeda, and W.W. Metcalf. 2013. Diversity and abundance of phosphonate biosynthetic genes in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 20759–20764.