

嫌気性細菌による芳香族化合物の変換反応

Conversion of Aromatic Compounds by Anaerobic Bacteria

篠 田 吉 史

YOSHIFUMI SHINODA

TEL: +49-761-203-2641 FAX: +49-761-203-2626

E-mail: yoshifumi.shinoda@biologie.uni-freiburg.de

Institut für Biologie II Mikrobiologie, Universität Freiburg, Schänzlestr.1, 79104 Freiburg i. Br., Germany

キーワード: 嫌気性細菌, 芳香族化合物, コルベ-シュミット合成, バーチ還元

Key words: anaerobic bacteria, aromatic compound, Kolbe-Schmitt synthesis, Birch reduction

(原稿受付 2005年10月5日/原稿受理 2005年10月25日)

1. はじめに

大型タンカーの座礁事故が相次いだ1980年代以降, 微生物や植物を使ったバイオレメディエーション技術の可能性が盛んに喧伝され, その中で嫌気微生物による物質分解は, 特に原位置における土壌や地下水汚染浄化に効果的であるとされてきた。

筆者は1995年, 芳香族化合物を嫌氣的に分解する脱窒細菌についての微生物学的研究を当時京都大学大学院におられた加藤暢夫教授の下で始め, 土壌中より新たに単離したフェノールやトルエンを嫌氣的に分解する細菌についてその性質を調べてきた⁵¹⁻⁵³⁾。

最初に単離に成功したトルエン分解細菌は, 嫌気条件下のみならず好気条件下においてもトルエンを単一炭素源として生育することが出来るという特徴を持つものであった。バイオレメディエーションへの嫌気微生物の応用を考えた際, 一つの微生物が酸素の有無にかかわらず汚染物質を分解できるというのは優れた性質である。遺伝子解析の結果, この *Thauera* sp. DNT-1 株が嫌気分解遺伝子と好気分解遺伝子の両方を持ち, 環境中の酸素の有無によってそれらを使い分けていることが示された⁴⁾。一方, ジャーファーメンターに窒素ガスを曝気して構築した脱窒性フェノール分解連続培養からは, らせん状のフェノール分解細菌の単離に成功した。これは当時芳香族化合物分解細菌としては知られていなかった *Magnetospirillum* 属に属することが分かり⁴⁾, この単離菌株が鉄イオン濃度の低い条件下でも良好な生育を示すことを利用して, トルエン等を分解する同様の細菌を自然界からさらに単離することに成功した⁴²⁾。現在 *Magnetospirillum* 属は芳香族化合物分解性脱窒細菌として第3のグループを形成すると考えられている^{2,42)}。

この10年ほどの間に, こうした分解細菌の単離から分解酵素のクローニングまで様々な研究が急速に進展し,

現在は特徴的な分解産物や分解遺伝子を汚染サイトにおいて検出することでサイトの分解能力を評価するといった検討がなされている^{3,4,20,26)}。一方で, 芳香族化合物は自然界において炭水化物に次いで2番目に多い化合物群とされ, その微生物代謝は古くから微生物学, 生化学者の関心を集めてきた。嫌気微生物による芳香族化合物分解というテーマで書かれた手元にある一番古い総説は1977年のもの¹⁷⁾であるから, すでに30年間続いているテーマであることが分かる。その間, 分解反応の化学的, 酵素学的側面を明らかにしようとする努力が地道に積み重ねられ, ユニークな反応, 反応機構の存在が明らかにされている^{14,19,31)}。

以下ではこうした芳香族化合物嫌気分解反応の微生物変換としての側面にスポットを当てる。まず嫌気微生物による芳香族化合物分解反応全体のアウトラインを示し, 次に多くの反応の中から嫌気微生物に特有とされるものをいくつか取り上げ, それらについて現在得られている知見を簡単に紹介する。さらにその中で特に興味を持たれている2つの反応について詳しく述べることにする。

2. 嫌気微生物による芳香族分解のストラテジー

この30年間で明らかになってきたのは, 芳香族化合物の嫌気微生物による分解は, 様々な化合物が変換経路を経て特定の化合物に収斂し, それ以後は共通の代謝経路で分解されるという漏斗型のスキームである (図1)。この収束部分を「ペリフェラル代謝 (peripheral metabolism)」, 共通部分を「中央代謝 (central metabolism)」と呼ぶ²⁴⁾。結節点となる化合物は, 中心的代謝中間体 (central intermediate) とよばれ, 現在のところ, ベンゾイル CoA, フロログルシノール, レゾルシノール, ヒドロキシヒドロキノンの4つであることが分かっている^{24,37)}。

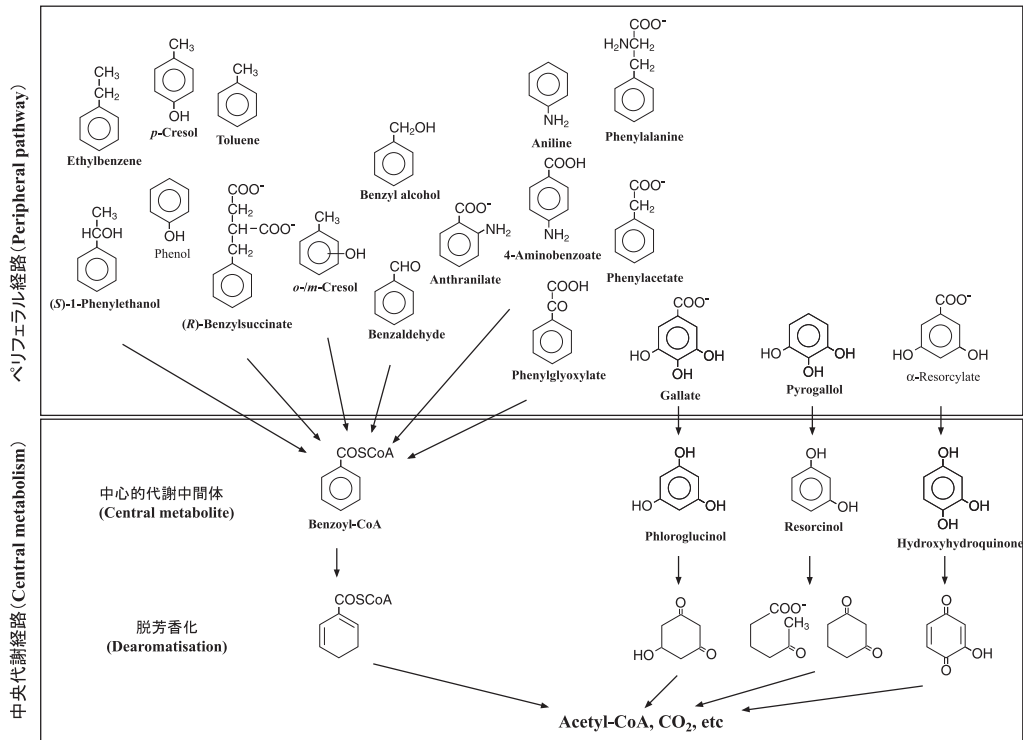


図1. 種々の芳香族化合物の嫌気分解経路におけるペリフェラル経路と中央代謝経路。

これらの化合物は、脂環式化合物へ還元（脱芳香化）され、開裂して脂肪族化合物となり、最終的に酢酸や酪酸に変換されるか、アセチル CoA, CO₂ にまで完全に分解される。大部分の芳香族化合物はベンズイル CoA に変換されることが分かっており、その他の3つの化合物に変換されるのは、互いにメタの位置にあるヒドロキシル基を複数持つ化合物に限られる。こうした化合物はケト-エノール互変異性により、ベンゼン環がオキソシクロヘキサン（セン）の形をとりうるため、芳香族化合物とし

てよりもむしろ脂環式化合物として分解されるからである。

3. 嫌気微生物特有の反応

こうした反応の中には、嫌気微生物特有の反応も多く存在する。以下、その中から比較的よく調べられているものをいくつか取り上げる（図2）。

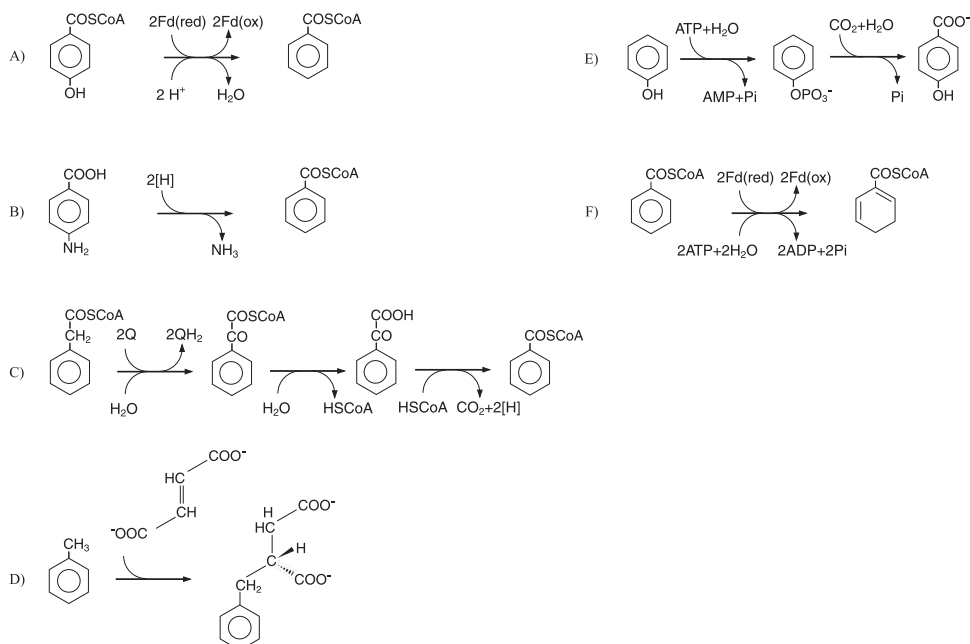


図2. 芳香族嫌気分解細菌に見られる特徴的な微生物変換反応。

3.1. 脱ヒドロキシル化

ベンゼン環について水酸基の脱離反応が存在する。光栄養細菌、脱窒細菌において、フェノールや *p*-クレゾールの代謝中間体である 4-ヒドロキシベンズイル CoA が脱ヒドロキシル化してベンズイル CoA になる反応 (図 2A) が知られており、前者では遺伝学的に証明され¹⁸⁾、後者では酵素が精製¹²⁾、結晶化⁴⁹⁾ されている。それによると、4-ヒドロキシベンズイル CoA レダクターゼ (EC 1.3.99.20) は 275 kDa の酵素で、 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ の構造を持つ。また、2つのモリブドプテリン、4つの [2Fe-2S]、2つの [4Fe-4S] クラスターを含むとともに、2つの FAD を持ち、酸素感受性である。モリブデン酵素のキサンチンオキシダーゼファミリーに属する酵素としては特異とされる反応機構が提唱されている⁸⁾。発酵性細菌からは 3-ヒドロキシ安息香酸を³³⁾、脱窒細菌からは 2-ヒドロキシ安息香酸を¹⁰⁾、それぞれ脱ヒドロキシル化する酵素活性が細胞抽出液に見つかっている。カテコールや *o*-クレゾールもそれぞれ硫酸還元細菌、脱窒細菌の細胞抽出液において一旦カルボキシル化されたのち脱ヒドロキシル化を受ける^{22,36)}。

3.2. 脱アミノ化

ベンゼン環は利用しないがトリニトロトルエンをトリアミノトルエンに還元し、トルエンにまで脱アミノ化してこれを窒素源とする硫酸還元菌の報告がある¹¹⁾。メタン発酵性培養においては、*m*-ニトロフェノールが同様に還元、脱アミノ化される⁴⁷⁾。3,4-フルオロアニリンは脱窒細菌によって 1,2-フルオロベンゼンに変換される⁴⁵⁾。より生化学的な研究としては、アニリンの *p*-位炭素がカルボキシル化され CoA チオエステルへ変換された 4-アミノベンズイル CoA の脱アミノ化活性が、硫酸還元菌の細胞抽出液で確認されている⁴⁰⁾ (図 2B)。2-アミノ安息香酸も CoA チオエステル化を経てアミノ基が脱離することが脱窒細菌の *in vitro* の系で分かっている²⁹⁾。しかし、これまでのところこれらの脱アミノ化反応を担う酵素については分かっていない。

3.3. α 酸化

芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンの嫌気的な代謝中間体であるフェニル酢酸は、脱窒細菌においてそのカルボキシメチル基が α 酸化されることが知られており³⁹⁾ (図 2C)、酵素が精製されている。フェニルアセチル CoA からフェニルグリオキシリル酸を生成する酵素は膜結合型モリブデン鉄硫黄酵素で、280 kDa の $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 構造を持ち、酸素非感受性で、 α 酸化の酵素は水に由来することが分かっている。4電子酸化である点、CoA チオエステルの加水分解も触媒する点において特異な酵素であるとされる³⁵⁾。このフェニルグリオキシリル酸を酸化してベンズイル CoA を生成する酵素は $\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2\epsilon_2$ の構造を持つ 370 kDa の FAD 含有鉄硫黄タンパク質で、こちらは酸素感受性である²⁵⁾。最近この反応経路は水田における稲藁のメタン発酵による分解においても確認された²¹⁾。

3.4. フマル酸付加

トルエンのメチル基にフマル酸を付加し、立体特異的に *R*-(+)-ベンジルコハク酸を合成する反応が詳細に調べられている⁹⁾ (図 2D)。この反応を触媒する酵素、ベンジルコハク酸シンターゼ (EC 4.1.99.11) は 220 kDa、 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ のラジカル酵素であり、これとは別に存在する活性化酵素によって α サブユニットに作られるグリシラジカルがトルエンから水素原子を引き抜き、生じたベンジラジカルがフマル酸を攻撃する²⁸⁾。このメチル基へのフマル酸の付加という現象は他の化合物の分解においても見られ、クレゾール、キシレン、硫酸還元菌におけるエチルベンゼン、2-メチルナフタレンといった芳香族化合物の他、直鎖アルカンやエチルシクロペンタンの分解においても提唱されている⁵⁰⁾。

こうした嫌気微生物特有の反応の中でも特に興味を持たれているのは、工業的な化学物質の合成に使われている反応を触媒する場合である。以下、そのような「Kolbe-Schmitt 合成」と「Birch 還元」について述べる。

4. Kolbe-Schmitt 合成

化粧品、医薬品、食品添加剤、液晶ポリマーなどの原料として使われる芳香族ヒドロキシカルボン酸 (サリチル酸、4-ヒドロキシ安息香酸、4-アミノサリチル酸、3-または 6-ヒドロキシ 2-ナフトン酸など) の化学合成に、Kolbe-Schmitt 合成という反応が使われている。これは、化学工業的にはフェノールやナフトールのアルカリ金属塩と CO₂ を高温高圧下において反応させ、芳香環にカルボキシル基を導入する反応である。

4.1. *Thauera aromatica* による反応

これと同様に、フェノールの *p*-位にカルボキシル基を導入して 4-ヒドロキシ安息香酸を合成する反応が嫌気性細菌に見つかっている (図 2E)。フェノールは、硫酸還元細菌¹⁾、鉄還元細菌³⁰⁾、脱窒細菌^{43,46)}、発酵性細菌²⁷⁾ の生育基質になることが知られているが、現在、その分解についての酵素学的な知見が得られているのは脱窒細菌 *Thauera aromatica* においてである^{38,41)}。この化学的には困難な反応を、この細菌は 2つの酵素による 2段階の反応に分けて実現する。フェノールは最初に「フェニルリン酸シンターゼ」(EC 2.7.9.-) によって ATP をリン酸源としたリン酸化を受け、このフェニルリン酸の *p*-位に「フェニルリン酸カルボキシラーゼ」(EC 4.1.1.-) が CO₂ を付加する。

4.2. フェニルリン酸シンターゼ³⁸⁾

フェニルリン酸シンターゼは 3つのサブユニットからなり、70 kDa の Subunit 1 は大腸菌のホスホエノールピルビン酸シンターゼ (EC 2.7.9.2) の中心部分、Subunit 2 (40 kDa) はその N 末端部分と相同性が高い。前者はリン酸が結合する保存性の高いヒスチジン残基を持つ。一方で、24 kDa の Subunit 3 は、既知のタンパクとの全体的な相同性がない。実験事実として、1) Subunit 1 はフェニルリン酸、フェノールと共存させると、フェニルリン酸からリン酸を奪って別のフェノール分子にすげ替える

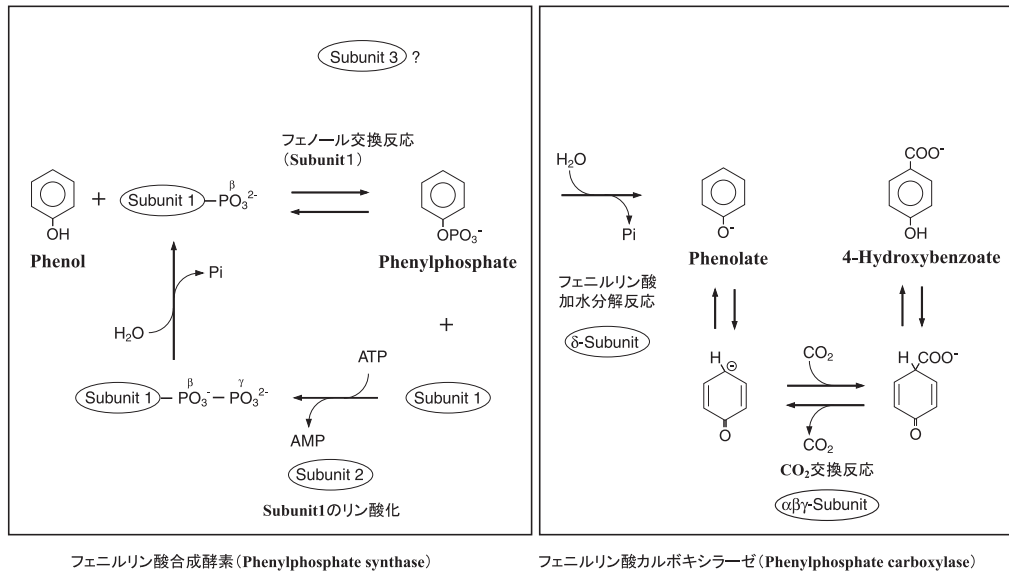


図 3. 生物学的 Kolbe-Schmitt 合成の反応スキーム。

「フェノール交換反応」を触媒する。2) Subunit 2 は, Subunit 1 をリン酸化する。3) 最終産物であるフェニルリン酸のリン酸基は, ATP の 3 つのリン酸基の真ん中のリン酸基 (β リン酸) に由来する, ということが知られている。ここから以下のような反応機構が推定されている (図 3)。まず, Subunit 2 が ATP からピロリン酸を Subunit 1 のヒスチジン残基に移し, そのあと γ リン酸が脱離する。 β リン酸でリン酸化された Subunit 1 はフェノール交換反応活性でこれをフェノールに転移し, フェニルリン酸に変換する。残りの Subunit 3 は, Subunit 1 が Subunit 2 によってリン酸化される速度を数倍に上昇させることが確認されているが, 実際の働きは分かっていない。

4.3. フェニルリン酸カルボキシラーゼ⁴¹⁾

こうして出来たフェニルリン酸は次に, フェニルリン酸カルボキシラーゼによって 4-ヒドロキシ安息香酸へと変換される。この酵素は 4 つのサブユニットからなり, α (54 kDa) β (53 kDa) γ (10 kDa) サブユニットは, CO_2 と 4-ヒドロキシ安息香酸と共存させて反応させると, 4 ヒドロキシ安息香酸から CO_2 が取れたフェノレートを切り取り, 別の CO_2 分子にすげ替える「 CO_2 交換反応」を触媒する。一方, δ サブユニットは単独で弱いフェニルリン酸加水分解活性を示し, フェノレートを生成する。従って, 反応機構としては δ サブユニットがフェニルリン酸からフェノレートを生成して $\alpha\beta\gamma$ サブユニットに結合させ, 後者は CO_2 交換反応活性でこれに CO_2 を付加させると考えられる (図 3)。

4.4. 反応機構は未知

リン酸基は電子吸引力であり, p -位炭素を CO_2 が求電子攻撃するためには不利な置換基のはずである。人為的には高温高压を使うしかない反応がこれらの酵素群によってどのような機構で行われているのかはまだ分かっていない。フェニルリン酸カルボキシラーゼは 2 価の金属イオンと K^+ を持ち, CO_2 が実際の基質であるという

点ではビオチン依存性カルボキシラーゼと同じであるが, ビオチンを持たないことから新しいタイプのカルボキシル化酵素であると考えられている。また, この酵素が酸素だけでなくジチオナイト由来の SO_2^- によっても迅速に失活することから, ラジカルの関与が示唆されている。

5. Birch 還元

Kolbe-Schmitt 合成と同様に医薬品中間体や香料製造に用いられているのが, Birch 還元という反応である。これは, ベンゼン環を還元して非共役シクロヘキサジエンを生成する。ベンゼン環の一電子酸化還元電位は, 置換基のないベンゼンの場合で -3 V と極めて低く電子を受け取りにくいので, 有機化学で用いられる還元剤の中でも特に強力な, 溶媒和電子 (溶媒中に単体で安定に存在する電子) を利用する。これはナトリウムやカリウムなどのアルカリ金属を低温条件下で液体アンモニアに溶かすことで生じさせることが出来る。これを電子供与体, アルコールをプロトン供与体として $-30\sim-60^\circ\text{C}$ とした条件下で反応させると, 電子がベンゼン環に転移してラジカルが生成し, このラジカルがアルコールからプロトンを奪って反応が完了する。

5.1. *T. aromatica* による反応

ペリフェラル反応が収斂する中心的代謝中間体の一つであるベンゾイル CoA は, 通性嫌気性細菌においてまさにこの Birch 還元と同じように電子を一つずつ付加され, プロトンが加わってシクロヘキサジエンに変換される (脱芳香化される) ことが分かっている (図 2F)。この反応を触媒する酵素, ベンゾイル CoA レダクターゼ (BCR) (EC 1.3.99.15) について, 詳細な反応機構が明らかになりつつある⁹⁾。

5.2. 酵素の構造と反応機構

T. aromatica の BCR は 170 kDa のヘテロテトラマー

で、A (49 kDa) B (48 kDa) C (44 kDa) D (30 kDa) の4つのサブユニットからなる。酵素は2つの部分に分けられ、A+DがATPの加水分解と電子の活性化を触媒し、B+Cがベンゾイル CoA の脱芳香化を担う。AD サブユニットの間には [4Fe-4S] クラスターが保持されていて、A, D それぞれに ATP 結合部位が一つずつ存在する。この二つのサブユニットはこの ATP 結合部位の相同性は高いが、残りの部分は大きさも異なり非対称になっている点で、反応機構の共通性が示唆されている2ヒドロキシアシル CoA デヒドラターゼとは異なる。一方、BC サブユニットは計15個のシステイン残基を持ち、そのうち8個が2つの [4Fe-4S] クラスターを保持していると考えられている。

先に述べたとおり、Birch 還元反応の問題は還元されるべき芳香族化合物の酸化還元電位が極めて低いことである。化学反応の場合にはそれに見合った酸化還元電位の低い還元剤を使用することで反応が成立するが、嫌気性細菌は強い還元剤を用意すると同時に、芳香環の酸化還元電位を上げるという戦略を採る (図4)。

5.3. 強力な還元剤をつくる

BCR に電子を供給するのはフェレドキシンであることが分かっており、BCR の合計3つの [4Fe-4S] クラスターと共に、酸化還元電位は -500 mV 程度と測定された⁹⁾。フェレドキシンから BCR に移った電子は、 $S=1/2$ という通常のスピン状態を採る。しかし、ここに ATP が加わり AD サブユニットによって加水分解されると、C サブユニットのヒスチジン残基がリン酸化され⁴⁸⁾、これがおそらくは [4Fe-4S] クラスターのコンフォメーション変化を伴い、電子が $S=7/2$ という高エネルギーのスピン状態を採るようになる⁷⁾。この「ATP 加水分解による

活性化」によって、クラスターの酸化還元電位が -500 mV 程度低下し、合計 -1 V の酸化還元電位を持つ、より還元力の強い電子供与体が用意されると考えられている (図4A)。

5.4. 芳香環の酸化還元電位を上げる

一方で、基質の酸化還元電位は CoA チオエステル化により上昇し、芳香環はより還元されやすくなる。遊離の安息香酸の酸化還元電位は、ベンゼンと同じく -3 V 程度であるとされているが、チオエステル化によって -1.9 V になると考えられている。これは、Buckel によると、CoA チオエステルの中のカルボニル基はアルデヒドやケトンの性質を帯びており、カルボニル炭素に電子が転移して出来るケチルラジカルが出来やすいためであるという (図4B, 枠内)¹⁹⁾。

そして電子供与体との残りの 1 V 弱の差を埋めるのは、一つは酵素タンパク質の水素残基がカルボニル酸素を弱くプロトン化することによってであろうと考えられている (図4C)。これによりケチルラジカルが安定化し、 250 mV 程度酸化還元電位を上げることが出来る。さらに、**動力学的な実験結果**はカルボニル炭素への電子転移と同時に *p*-位炭素のヒドロキシル化がおこることを示している。これによってラジカルアニオンの生成を回避し、さらに酸化還元電位を押し上げ、常温常圧における Birch 還元が実現するのである³²⁾。

5.5. BCR の分布

T. aromatica の他に BCR 遺伝子を持つことが知られている細菌には、脱窒細菌の *Azoarcus evansii*²³⁾ と *Magnetospirillum* 属細菌^{2,42)}、光合成細菌の *Rhodospseudomonas palustris*¹⁵⁾ がある。このうち *A. evansii* の遺伝

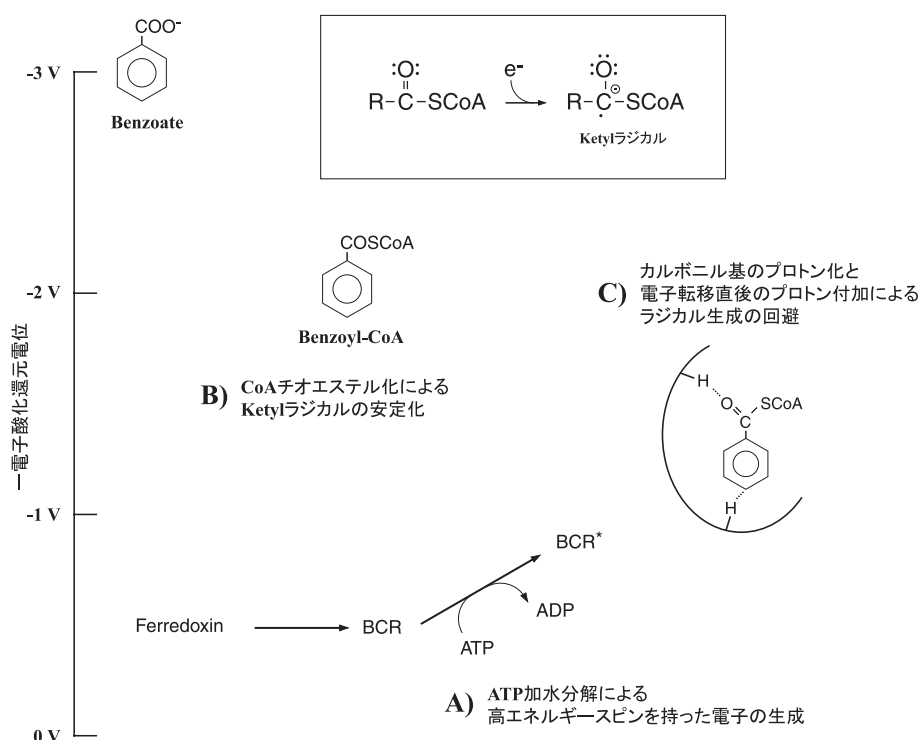


図4. 生物学的 Birch 還元における一電子酸化還元電位障壁の克服。

子だけがその他の相同遺伝子配列と大きく異なっており、*T. aromatica* の BCR とはまた異なる機構で反応を行っている可能性がある。

一方、これら通性嫌気性細菌に対し偏性嫌気性細菌には BCR は見つかっていない。鉄還元細菌 *Geobacter metallireducens* は種々の芳香族化合物を分解するが、解読されたゲノム上に BCR に相当する遺伝子はなく、ベンゾイル CoA の分解にはセレンとモリブデンを含む未知の酵素が機能していることが示唆されている³⁴⁾。偏性嫌気性の共栄養性細菌における安息香酸分解では、最初に 4-6 電子還元によってシクロヘキセンが生成する¹⁶⁾とされており、脱窒細菌とは異なる機構でベンゼン環が還元されている可能性が高い。

6. 結 び

このように芳香族化合物の嫌気分解微生物には様々な特殊な反応が存在するが、こうした反応のいわゆる微生物変換反応としての利用はまだ行われていない。嫌気微生物の利用については、好気微生物と比べた時の生育速度の遅さ、細胞収率の低さ、酸素による微生物細胞や酵素の傷害など多くの問題があり、それは簡単なことではないだろう。

しかし同時に、それは未来永劫解決されない問題ではないだろう。今や数百に上る微生物ゲノムが解読され、数万のタンパク質の立体構造が解明され、様々な「オーム」の動態を解明して、*in silico* で生命活動を再現しようという時代である。そうした中から嫌気微生物の「扱いくさ」を払拭する手がかりが得られ、「嫌気微生物の応用=メタン発酵」という常識が覆る日も、そう遠くないかもしれない。筆者は現在、ここで述べた嫌気微生物による芳香族化合物分解の酵素反応という学問領域をこの20年ほどの間に切り拓いた研究室に滞在しているが、そこには様々なノウハウはあっても「嫌気だから」という特別な感覚はない。必要なことは、そうした先入見を排して嫌気微生物の世界に分け入ることであろう。

「(分子状) 酸素がない」というだけのために、嫌気微生物は巧妙な反応プロセスを進化させてきた。地球上に存在する広大な嫌気環境を考えれば、そこには豊かな可能性を持つ微生物がまだまだ多く眠っているに違いないと思われるのである。

謝 辞

筆者のドイツ留学に際しては、財団法人山田科学振興財団から援助を受けた。加藤暢夫教授、受け入れ先のフライブルク大学 G. Fuchs 教授、M. Boll 助教授に謝意を表す。

文 献

- 1) Bak, F., and F. Widdel. 1986. Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. Arch. Microbiol. 146: 177-180.
- 2) Barragan, M.J.L., E. Diaz, J.L. Garcia, and M. Carmona. 2004. Genetic clues on the evolution of anaerobic catabolism of aromatic compounds. Microbiology 150: 2018-2021.
- 3) Beller, H.R. 2002. Analysis of benzy succinates in groundwater by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its use for monitoring *in situ* BTEX biodegradation. Environ. Sci. Technol. 36: 2724-2728.
- 4) Beller, H.R., S.R. Kane, T.C. Legler, and P.J. Alvarez. 2002. A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. Environ. Sci. Technol. 36: 3977-3984.
- 5) Boll, M. 2005. Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. Biochim. Biophys. Acta. 1707: 34-50.
- 6) Boll, M., G. Fuchs, and J. Heider. 2002. Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. Curr. Opin. Chem. Biol. 6: 604-611.
- 7) Boll, M., G. Fuchs, and D.J. Lowes. 2001. Single turnover EPR studies of benzoyl-CoA reductase. Biochemistry 40: 7612-7620.
- 8) Boll, M., G. Fuchs, C. Meier, A. Trautwein, A. El Kasm, S.W. Ragsdale, G. Buchanan, and D.J. Lowe. 2001. Redox centers of 4-hydroxybenzoyl-CoA reductase, a member of the xanthine oxidase family of molybdenum-containing enzymes. J. Biol. Chem. 276: 47853-47862.
- 9) Boll, M., G. Fuchs, C. Meier, A. Trautwein, and D.J. Lowe. 2000. EPR and Mössbauer studies of benzoyl-CoA reductase. J. Biol. Chem. 275: 31857-31868.
- 10) Bonting, C.F., and G. Fuchs. 1996. Anaerobic metabolism of 2-hydroxybenzoic acid (salicylic acid) by a denitrifying bacterium. Arch. Microbiol. 165: 402-408.
- 11) Boopathy, R., C.F. Kulpa, and M. Wilson. 1993. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Desulfobacterium* sp (B-strain). Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 270-275.
- 12) Brackmann, R., and G. Fuchs. 1993. Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase (dehydroxylating) from a denitrifying *Pseudomonas* species. Eur. J. Biochem. 213: 563-571.
- 13) Buckel, W., and R. Keese. 1995. One-electron redox reactions of CoASH esters in anaerobic bacteria - a mechanistic proposal. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 34: 1502-1506.
- 14) Chakraborty, R., and J.D. Coates. 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 437-446.
- 15) Eglund, P.G., D.A. Pelletier, M. Dispensa, J. Gibson, and C.S. Harwood. 1997. A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 6484-6489.
- 16) Elshahed, M.S., V.K. Bhupathiraju, N.Q. Wofford, M.A. Nanny, and M.J. McInerney. 2001. Metabolism of benzoate, cyclohex-1-ene carboxylate, and cyclohexane carboxylate by "*Syntrophus aciditrophicus*" strain SB in syntrophic association with H₂-using microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1728-1738.
- 17) Evans, W.C. 1977. Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. Nature 270: 17-22.
- 18) Gibson, J., M. Dispensa, and C.S. Harwood. 1997. 4-hydroxybenzoyl coenzymeA reductase (dehydroxylating) is required for anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate by *Rhodospseudomonas palustris* and shares features with molybdenum-containing hydroxylases. J. Bacteriol. 179: 634-642.
- 19) Gibson, J., and C.S. Harwood. 2002. Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. Annu. Rev. Microbiol. 56: 345-369.
- 20) Gieg, L.M., and J.M. Suflita. 2002. Detection of anaerobic metabolites of saturated and aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated aquifers. Environ. Sci. Technol. 36: 3755-3762.
- 21) Glissmann, K., E. Hammer, and R. Conrad. 2005. Production of aromatic compounds during methanogenic degradation of

- straw in rice field soil. FEMS Microbiol. Ecol. 52: 43–48.
- 22) Gorny, N., and B. Schink. 1994. Anaerobic degradation of catechol by *Desulfobacterium* sp. strain Cat2 proceeds via carboxylation to protocatechuate. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3396–3400.
 - 23) Harwood, C.S., G. Burchhardt, H. Herrmann, and G. Fuchs. 1999. Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. FEMS Microbiol. Rev. 22: 439–458.
 - 24) Heider, J., and G. Fuchs. 1997. Microbial anaerobic aromatic metabolism. Anaerobe 3: 1–22.
 - 25) Hirsch, W., H. Schagger, and G. Fuchs. 1998. Phenylglyoxylate: NAD⁺ oxidoreductase (CoA benzoylating), a new enzyme of anaerobic phenylalanine metabolism in the denitrifying bacterium *Azoarcus evansii*. Eur. J. Biochem. 251: 907–915.
 - 26) Hosoda, A., Y. Kasai, N. Hamamura, Y. Takahata, and K. Watanabe. 2005. Development of a PCR method for the detection and quantification of benzoyl-CoA reductase genes and its application to monitored natural attenuation. Biodegradation 16: 591–601.
 - 27) Juteau, P., V. Cote, M.F. Duckett, R. Beaudet, F. Lepine, R. Villemur, and J.G. Bisailon. 2005. *Cryptanaerobacter phenolicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobe that transforms phenol into benzoate via 4-hydroxybenzoate. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 245–250.
 - 28) Leuthner, B., C. Leutwein, H. Schulz, P. Horth, W. Haehnel, E. Schiltz, H. Schagger, and J. Heider. 1998. Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycol radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. Mol. Microbiol. 28: 615–628.
 - 29) Lochmeyer, C., J. Koch, and G. Fuchs. 1992. Anaerobic degradation of 2-aminobenzoic acid (anthranilic acid) via benzoyl-coenzyme A (CoA) and cyclohex-1-enecarboxyl-CoA in a denitrifying bacterium. J. Bacteriol. 174: 3621–3628.
 - 30) Lovley, D.R., M.J. Baedeker, D.J. Lonergan, I.M. Cozzarelli, E.J.P. Phillips, and D.I. Siegel. 1989. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. Nature 339: 297–299.
 - 31) Meckenstock, R.U., M. Safinowski, and C. Griebler. 2004. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. FEMS Microbiol. Ecol. 49: 27–36.
 - 32) Mobitz, H., and M. Boll. 2002. A birch-like mechanism in enzymatic benzoyl-CoA reduction: A kinetic study of substrate analogues combined with an ab initio model. Biochemistry 41: 1752–1758.
 - 33) Muller, J.A., and B. Schink. 2000. Initial steps in the fermentation of 3-hydroxybenzoate by *Sporotomaculum hydroxybenzoicum*. Arch. Microbiol. 173: 288–295.
 - 34) Peters, F., M. Rother, and M. Boll. 2004. Selenocysteine-containing proteins in anaerobic benzoate metabolism of *Desulfococcus multivorans*. J. Bacteriol. 186: 2156–2163.
 - 35) Rhee, S.K., and G. Fuchs. 1999. Phenylacetyl-CoA: acceptor oxidoreductase, a membrane-bound molybdenum-iron-sulfur enzyme involved in anaerobic metabolism of phenylalanine in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. Eur. J. Biochem. 262: 507–515.
 - 36) Rudolphi, A., A. Tschech, and G. Fuchs. 1991. Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. Arch. Microbiol. 155: 238–248.
 - 37) Schink, B., B. Philipp, and J. Muller. 2000. Anaerobic degradation of phenolic compounds. Naturwissenschaften 87: 12–23.
 - 38) Schmeling, S., A. Narmandakh, O. Schmitt, N. Gad'on, K. Schuhle, and G. Fuchs. 2004. Phenylphosphate synthase: a new phosphotransferase catalyzing the first step in anaerobic phenol metabolism in *Thauera aromatica*. J. Bacteriol. 186: 8044–8057.
 - 39) Schneider, S., M.E. Mohamed, and G. Fuchs. 1997. Anaerobic metabolism of L-phenylalanine via benzoyl-CoA in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. Arch. Microbiol. 168: 310–320.
 - 40) Schnell, S., and B. Schink. 1991. Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. Arch. Microbiol. 155: 183–190.
 - 41) Schuhle, K., and G. Fuchs. 2004. Phenylphosphate carboxylase: a new C-C lyase involved in anaerobic in phenol metabolism in *Thauera aromatica*. J. Bacteriol. 186: 4556–4567.
 - 42) Shinoda, Y., J. Akagi, Y. Uchihashi, A. Hiraishi, H. Yukawa, H. Yurimoto, Y. Sakai, and N. Kato. 2005. Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 1483–1491.
 - 43) Shinoda, Y., Y. Sakai, M. Ue, A. Hiraishi, and N. Kato. 2000. Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1286–1291.
 - 44) Shinoda, Y., Y. Sakai, H. Uenishi, Y. Uchihashi, A. Hiraishi, H. Yukawa, H. Yurimoto, and N. Kato. 2004. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1385–1392.
 - 45) Travkin, V., B.P. Baskunov, E.L. Golovlev, M.G. Boersma, S. Boeren, J. Vervoort, W.J.H. van Berkel, I. Rietjens, and L.A. Golovleva. 2002. Reductive deamination as a new step in the anaerobic microbial degradation of halogenated anilines. FEMS Microbiol. Lett. 209: 307–312.
 - 46) Tschech, A., and G. Fuchs. 1987. Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. Arch. Microbiol. 148: 213–217.
 - 47) Tseng, S.K., and C.J. Yang. 1994. The reaction characteristics of waste-water containing nitrophenol, treated using an anaerobic biological fluidized-bed. Water Sci. Technol. 30: 233–240.
 - 48) Unciuleac, M., and M. Boll. 2001. Mechanism of ATP-driven electron transfer catalyzed by the benzene ring-reducing enzyme benzoyl-CoA reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 13619–13624.
 - 49) Unciuleac, M., M. Boll, E. Warkentin, and U. Ermler. 2004. Crystallization of 4-hydroxybenzoyl-CoA reductase and the structure of its electron donor ferredoxin. Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 60: 388–391.
 - 50) Widdel, F., and R. Rabus. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 259–276.
 - 51) 篠田吉史, 乾 将行, 湯川英明. 2004. 環境浄化への嫌気微生物の活用を目指して. バイオサイエンスとインダストリー. 62: 31–34.
 - 52) 篠田吉史, 阪井康能, 加藤暢夫. 2005. 脱窒性細菌による芳香族化合物の嫌気分解—微生物代謝の新たなフロンティア. 用水と排水. 47: 182–189.
 - 53) 篠田吉史, 阪井康能, 加藤暢夫. 2000. 原位置バイオレメディエーションに有効な脱窒細菌による芳香族化合物の嫌気分解. バイオサイエンスとインダストリー. 58: 693–698.