

Rhodococcus 属細菌の菌体外多糖のバイオロジー Biology of Extracellular Polysaccharides Produced by Rhodococci

浦 井 誠
MAKOTO URAI

日本大学生物資源科学部応用生物科学科 〒 252-8510 藤沢市亀井野 1866
TEL: 0466-84-3706 FAX: 0466-84-3354
E-mail: nakajima@brs.nihon-u.ac.jp

Department of Applied Biological Science, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa, Kanagawa
252-8510, Japan

キーワード: *Rhodococcus*, 菌体外多糖, 構造と機能, バイオリメディエーション, 機能性バイオポリマー
Key words: *Rhodococcus*, extracellular polysaccharide, structure and function, bioremediation, biopolymer

(原稿受付 2007年5月9日/原稿受理 2007年5月16日)

1. はじめに

Rhodococcus 属細菌は, PCB などのハロゲン化炭化水素や石油成分など, 数多くの難分解性化合物に対して強い資化性を示す株が多数知られていることから^{3,4,7,13,15,19,42,44}, バイオリメディエーション等の環境浄化への応用が期待されている菌群である⁴⁰。この *Rhodococcus* 属細菌を実際に汚染環境の浄化に利用するためには, 汚染環境中での *Rhodococcus* 属細菌の挙動や, 汚染物質との接触・取り込みのメカニズムを理解する必要があり, そのためには, 細胞表層構造の特徴を詳細に把握することが重要である。*Rhodococcus* 属細菌はグラム陽性細菌であるが, 結核菌に代表されるような²¹ 細胞表層にミコール酸を含む細菌群 (Mycolata) に属しており, 特徴的な細胞表層構造をもっている。ミコール酸とは α -アルキル- β -ヒドロキシ-脂肪酸であり, *Rhodococcus* 属細菌のもつミコール酸は総炭素数が 35 から 45 ほどの高級脂肪酸である^{8,22}。Sutcliffe は, 研究の進んでいる結核菌の細胞表層モデル^{5,21} に基づいて, *R. equi* の細胞表層モデルを提案した (図 1)³²。このモデルによると, 通常のグラム陽性細菌に見られるリン脂質二重層からなる細胞膜とペプチドグリカン層の外側に, アラビノガラクトサンを介してミコール酸が結合し, ミコール酸の膜状構造をもっていると考えられている。また, このミコール酸膜には, 糖脂質やタンパク質も存在していることが報告されている^{1,14,17}。このミコール酸が細胞壁の外側に, あたかもグラム陰性細菌の外膜のように存在していることから, *Rhodococcus* 属細菌は環境中において, 通常の細菌とは異なる挙動を示すことが予想される。さらに, *Rhodococcus* 属細菌にはこのミコール酸層のさらに外側に, 菌体外多糖 (Extracellular polysaccharides, EPS) を分泌する株が存在する。微生物の生産する EPS は, 代表的な細胞外構成物質として多く

の微生物に共通して見られ^{18,26}, バイオフィルムの主要構成成分としても知られているが^{6,33,43}, その構造は多様であり, 構造と機能との関係は不明な点が多い。*Rhodococcus* 属細菌の生産する EPS では, 馬の気管支炎, 肺炎の原因菌である *R. equi* で, その抗原性から糖鎖構造の解析が進んでいる。これまでに 7 種類の serotype が知られておりその糖鎖構造が決定されているが^{16,20,25,27-29}, その他の *Rhodococcus* 属細菌の生産する EPS の機能や構造はほとんど明らかになっていない。近年, 我々の研究グループで, この *Rhodococcus* 属細菌の環境浄化への応用という観点から EPS の機能の解明を試みてきた結果, この EPS には様々な機能があり, その構造も特徴的であることが明らかになってきた。そこで本総説では, 環境の浄化への応用が期待される様々な炭化水素耐性 *Rhodococcus* 属細菌の生産する EPS の機能と構造について紹介する。また, *Rhodococcus* 属細菌の EPS には高い界面活性能や保湿・吸湿能をもつものが存在することを見出したため, 環境や人体に対する負荷の少ない機能性素材として応用していきたいと考え, これら EPS の機能と構造との関係についても検討

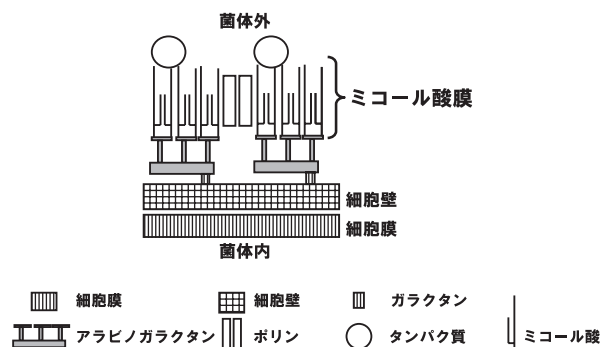


図 1. *Rhodococcus* 属細菌の細胞表層構造。

したので紹介する。

2. 炭化水素耐性菌の生産する EPS の機能と構造

2.1. 石油耐性・分解菌 *R. rhodochrous* S-2 の EPS

石油による環境汚染は、千種類以上の炭化水素の混合物による複合汚染である。しかし、海洋における石油汚染では、揮発性の高い低分子の炭化水素や生分解を受けやすい直鎖アルカンなどは、比較的短期間で海洋環境から除去・分解され、難揮発性の高分子炭化水素、特に多環芳香族炭化水素 (PAHs) が長期間残留することが知られている。したがって、微生物を用いて石油汚染海洋を浄化するためには、PAHs に対する耐性・分解能をもつ微生物を利用することが重要であると考えられる。そこで、*Rhodococcus* 属細菌には難分解性の芳香族炭化水素に対する資化能をもつものが多数報告されていることから、様々な *Rhodococcus* 属細菌について石油存在下での生育を検討した。石油は予め分画した芳香族炭化水素含有画分を実験に供した。その結果、寒天培地上でムコイド型のコロニー形態を示す株は、その種にかかわらず石油の存在下で生育できるのに対して、ラフ型のコロニー形態を示す株は生育できないことを明らかにした¹¹⁾。*Rhodococcus* 属細菌のラフ型株、ムコイド型株の性質の違いについて、*R. rhodochrous* の同じ親株から取得したコロニー形態変異株⁴¹⁾を用いて検討した結果 (図 2, 表 1)^{10,31)}、寒天培地上でラフ型のコロニー形態を示す R-2 株は EPS の生産量が少なく、接触角法を用いて細胞表面の疎水性を測定した結果高い疎水性を示し、ガラスなどの疎水性表面や炭化水素などの疎水性物質に対して強い吸着を示した。一方、ムコイド型のコロニー形態を示す S-2 株は EPS を多量に生産し、その細胞表面の疎水性は低かった。また、ムコイド型株の生産する EPS を抽出・精製し (S-2 EPS)、ラフ型株に対して添加した結果、疎水性表面に対する吸着が阻害された。このように、ラフ型株とムコイド型株の違いは EPS 生

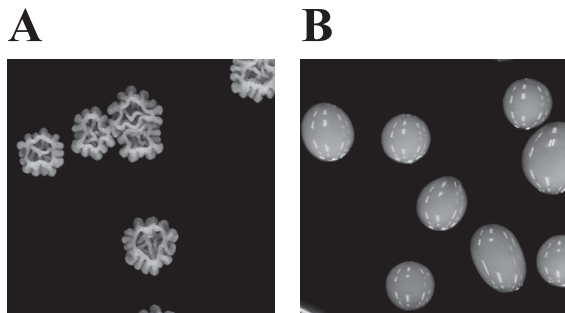


図 2. *Rhodococcus* 属細菌のコロニー形態。
(A) ラフ型株 *R. rhodochrous* R-2, (B) ムコイド型株 *R. rhodochrous* S-2。

表 1. ラフ型株とムコイド型株の EPS 生産量と細胞表面の疎水性。

Strain	EPS-yield (mg/g cells)	Contact Angle (°)
R-2	2.7 (±3.8)	>90
S-2	136.6 (±7.9)	34.3

産量の違いによる細胞表面疎水性の違いであり、ミコール酸をもつことにより疎水的な細胞表面をもつ *Rhodococcus* 属細菌が生産する EPS は、その疎水性を低下させる Hydrophilin として機能し、石油のような疎水性の高い毒性物質に対するバリアーとなっていることが予想された。そこで、石油存在下で生育できないラフ型株に対して S-2 EPS を添加、混合し、石油存在下での生育を検討した結果、ラフ型株でも生育できるようになることを見出した (図 3)¹¹⁾。この結果から、S-2 EPS は石油耐性に関与し、EPS を生産しない石油耐性のない株に対しても、石油耐性を付与できることを明らかにした。また、その後の研究で S-2 EPS は実際の海洋汚染でも有用であることが明らかとなった¹²⁾。

そこで、この S-2 EPS の構造決定を試みた。S-2 EPS は、寒天培地上で培養した菌体を生理食塩水に懸濁し、激しく攪拌することにより菌体から遊離するため、この遠心上清から S-2 EPS を精製した。この精製 S-2 EPS は、電気泳動的に単一のバンドを示す酸性の多糖であり、ゲルろ過による分子量の推定を行った結果、分子量 200 万のデキストランより早く溶出する単一のピークを得たことから、その分子量は 200 万以上の高分子多糖であると考えられた。組成分析を行った結果、D-グルクロン酸 (D-GlcA), D-マンノース (D-Man), D-グルコース (D-Glc), D-ガラクトース (D-Gal) がほぼ等モル検出され、脂肪酸分析によりパルミチン酸とステアリン酸がそれぞれ重量%で 2.7%, 0.8% 検出された。これら脂肪酸は、アルカリ加水分解により遊離してきたことから、糖鎖に対してエステル結合していることが推測され、また、この重量%から、その置換度は、糖 50 残基に脂肪酸が 1 つ結合している程度であると予想された。さらに、メチル化分析や NMR 分析、部分酸加水分解により単離した複数のオリゴ糖の構造解析を組み合わせると S-2 EPS の糖鎖構造の決定を試みた結果、その糖鎖構造は酸性糖である D-GlcA を側鎖としてもつ以下に示すような 4 種の糖の繰り返し構造であると決定した: [3]-[β-D-GlcpA-(1→2)-]α-D-Manp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3)-α-D-Galp-(1→)_n

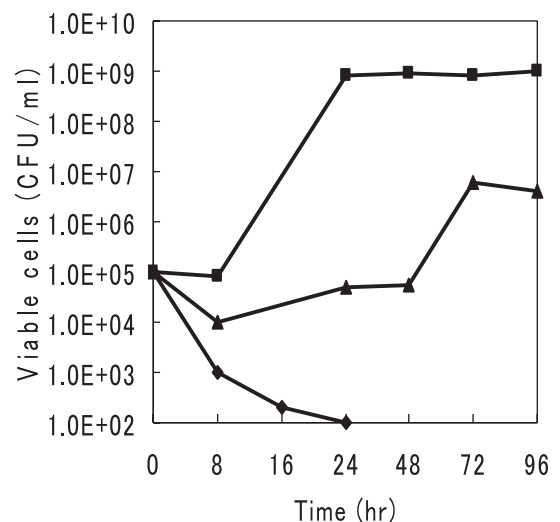


図 3. *R. rhodochrous* の石油存在下での生育。
■, *R. rhodochrous* S-2; ◆, *R. rhodochrous* R-2; ▲, S-2 EPS を添加した *R. rhodochrous* R-2。

(図 4)³⁵⁾。

これまでの結果から、ラフ型株の石油耐性の上昇に関与する S-2 EPS の重要な機能の一つとして、石油の乳濁化能が挙げられ、この乳濁化能と S-2 EPS の構造との関係について検討した。S-2 EPS の特徴的な構造として、脂肪酸エステルに注目し、アルカリ加水分解により脂肪酸を除去した EPS (DeAcyl S-2 EPS) と、脂肪酸を除去した EPS に再びパルミチン酸を人工的に付加した EPS (ReAcyl S-2 EPS) とを調整した (表 2)。その結果、脂肪酸を除去することにより、石油乳濁化能は失われた。これに対して、再度パルミチン酸を付加したものは、再び乳濁化能が回復したことから、EPS に含まれる脂肪酸が、石油の乳濁化に重要な働きをしていることを明らかにした。ここから、S-2 EPS に様々な化学修飾を施したり、S-2 EPS 類似物質を合成することで、同菌の石油耐性に関与するメカニズムが明らかになると考えられる。

2.2. ベンゼン耐性・分解菌 *Rhodococcus* sp. 33 の EPS

工場跡地の土壌や地下水などの閉鎖的な環境における石油汚染では、前述した海洋のような開放的環境における石油汚染とは異なり、ベンゼンのような低分子の揮発性炭化水素の残留による汚染も問題となっている。*Rhodococcus* sp. 33 は、石油精製工場跡地の土壌から単離された、飽和濃度のベンゼンに対しても耐性を示すベンゼン資化性菌であり²⁴⁾、この株も EPS を多量に生産する。そこで、EPS を多量に生産する親株から、EPS をほとんど生産しないラフ型変異株を単離し、このコロニー形態とベンゼン耐性との関連について検討した²⁾。その結果、親株であるムコイド型株はベンゼン耐性を示すのに対して、EPS をほとんど生産しないラフ型変異株はベンゼン耐性を示さなかった。また、親株の生産する EPS を精製し (33 EPS)、ラフ型株に対して添加した結果、ラフ型株はベンゼン耐性を示した。これらのことから、ベンゼン耐性にも EPS が関与し、ベンゼン分解能をもっている耐性のない株に対して、耐性を付与できることを明らかにした。

この 33 EPS についても構造決定を試みた結果、高分子の酸性多糖であり、その構造は以下に示すような、ピルビン酸を含む 4 種類の糖の繰り返しであると決定し

た： $[4\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Manp4,6(S-Pyr)-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-(1\rightarrow)}_n$ 。ピルビン酸は、D-Man の 4 位と 6 位に架橋するようにアセタール結合し、その絶対配置は S 型であると決定した³⁴⁾。

そこで、このベンゼン耐性に関与する 33 EPS を化学的に修飾し、ベンゼン耐性のないラフ型株に対して、ベンゼンと共に添加することにより、ベンゼン耐性に必要な EPS の構造について検討を加えた^{2,34)}。調整したサンプルは、弱い酢酸加水分解でピルビン酸のアセタール結合を切断し、ピルビン酸のみを除去した EPS、水素化ホウ素ナトリウムを用いてピルビン酸および D-GlcA のカルボキシル基をヒドロキシメチル基に還元した中性の EPS、部分酸加水分解により糖の重合度を 5 から 12 程度にしたオリゴ糖で (図 5)、これらをラフ型株に対してベンゼンと共に添加、培養した。その結果、これら化学修飾した EPS は、いずれもラフ型株に対してベンゼン耐性を付与しなかった。したがって、ベンゼン耐性に必要な EPS の構造は、ピルビン酸を含む酸性の高分子構造であると示唆された。

このように 33 EPS は、ベンゼン分解能をもっている耐性のない株に対して耐性を付与できることから、ベンゼン汚染環境に存在する微生物群集にもベンゼン耐性を付与し、分解を促進できる可能性が期待できる。また、33 EPS に対しても様々な化学修飾を施したりすることで、同菌のベンゼン耐性に関与するメカニズムが明らかになると考えられる。

2.3. 分岐鎖アルカン分解菌 *R. erythropolis* PR4 の EPS

PR4 株は、難分解性の分岐鎖アルカンである 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (プリスタン) に対する分解性を示す海洋性細菌であり⁹⁾、高い有機溶媒耐性をもつ

表 2. 化学修飾 S-2 EPS の脂肪酸含量% (w/w)。

EPS	Palmitic acid	Stearic acid
S-2 EPS	2.7	0.8
DeAcyl S-2 EPS	N.D.	N.D.
ReAcyl S-2 EPS	1.7	N.D.

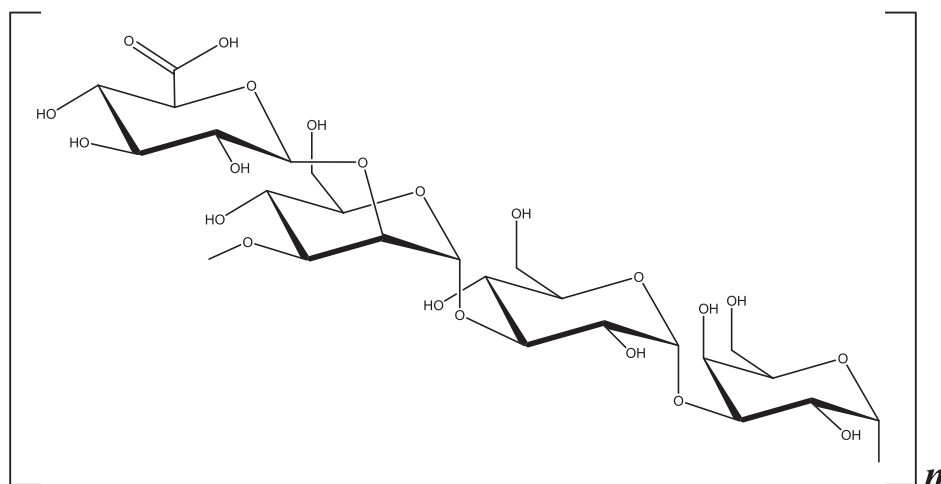


図 4. S-2 EPS の構造。

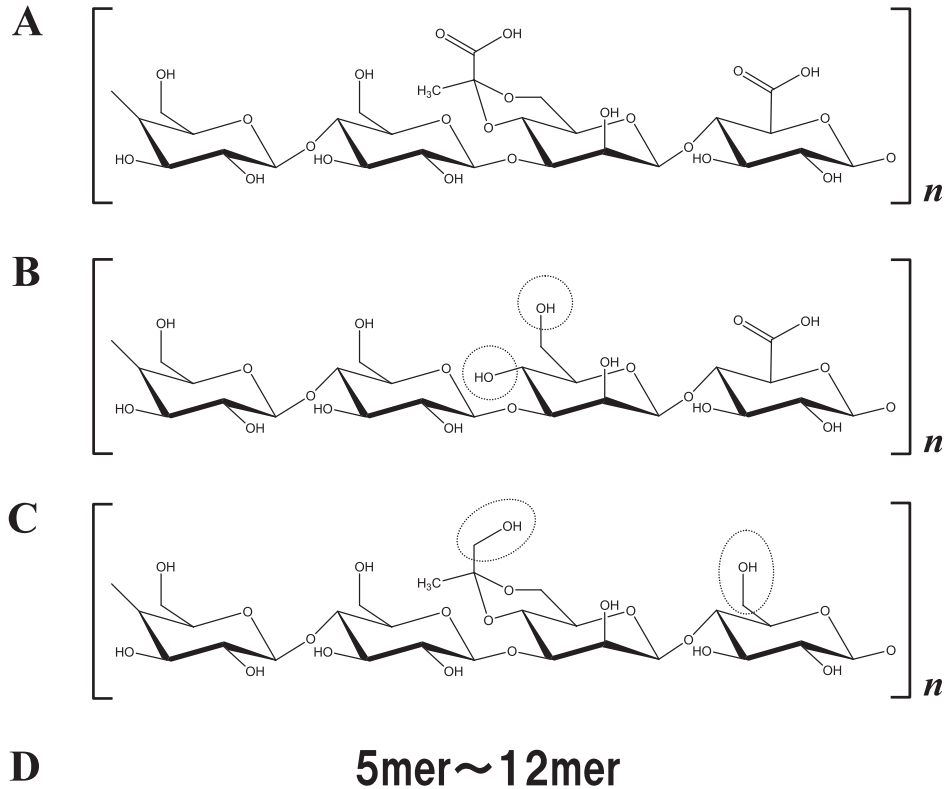


図5. 化学修飾した33 EPSの構造。

(A) Native 33 EPS, (B) Depyruvylated 33 EPS, (C) Reduced 33 EPS, (D) Partially hydrolysed 33 EPS.

とされ、近年ゲノム解析が行われた。このPR4株も、寒天培地上でムコイド型のコロニー形態を示し、EPSを多量に生産することから、EPSの抽出・精製を試みた。その結果、PR4株は2種類の酸性EPS (Fr1, Fr2)を同時に生産することを明らかにした。石油の乳濁化能を検討した結果、Fr1は乳濁化能を示さなかったが、Fr2は強い乳濁化能を示した。これら2種類のEPSの構造を決定した結果、石油乳濁化能をもつFr2は脂肪酸を含み、以下に示すような4種類の糖とピルビン酸から成る構造の繰り返しであると決定した：[4]-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Manp4,6(S-Pyr)-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→)_n³⁸⁾。このEPSもアルカリ処理により石油乳濁化能を失うことから、脂肪酸が界面活性能に重要であることが示唆された。また、Fr1については、まだ明確な機能は明らかとなっていないが、N-アセチル-D-グルコサミン (D-GlcNAc) やL-フコース (L-Fuc) を含み、D-Glcを側鎖とする以下に示すような5糖から成る構造の繰り返しであると決定した：[4]-[β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→3)-β-D-GlcpNAc-(1→4)-α-D-GlcpA-(1→3)-α-L-Fucp-(1→)]_n³⁹⁾。これら決定したEPSの構造に関する情報とゲノム情報とを合わせて、これらEPSの機能がより詳細に解明されることが期待できる。

3. 界面活性能、保湿・吸湿能をもつEPSの構造

これまでの結果から、*Rhodococcus* 属細菌の生産するEPSは分子内に親水性領域や疎水性領域、酸性領域などが混在する polyphilic な高分子化合物であることを明

らかにした。そこで、このEPSを環境や人体に対する負荷の少ない機能性素材として様々な分野に応用できると考え、界面活性剤、保湿・吸湿剤としての応用について検討した。これまでに、S-2 EPSやPR4株のEPSが高分子の酸性多糖で脂肪酸を含むことにより、石油乳濁化能をもつことを述べた。そこで、その他のムコイド型株が生産するEPSについても石油に対する乳濁化能を検討した結果、複数の株のEPSで強い界面活性能が認められた^{36,37)}。これらEPSは、構成糖の種類や存在比が異なっていることから、その糖鎖構造は多様であると考えられる。しかし、電気泳動の易動度は類似していることから、EPS分子の電荷状況は類似しており、また、共通して脂肪酸を含むことが明らかとなった。これらEPSもアルカリ処理により乳濁化能を失うことから、脂肪酸が界面活性能に重要であることが示唆された。

次に、EPSの保湿・吸湿剤としての応用について検討した。微生物の生産するEPSは、バイオフィルムの主要構成成分として知られており、その代表的な機能としてバイオフィルム内に生息する微生物群の乾燥耐性に重要であると言われている。そこで、*Rhodococcus* 属細菌の生産するEPSについても、高い保湿能をもつことが予想された。保湿能の測定は、EPSを乾燥後、サンプル重量の20%の水を加え、湿度を保ったデシケーター内に24時間放置した後、再度重量を測定して、添加した水を全て保持した場合を100%とした。測定の結果、37°Cで相対湿度11%という低湿度環境下において、複数のEPSで保湿剤や吸湿剤としてよく利用されているヒアルロン酸や尿素、グリセロール、シリカゲルに比べ、

表 3. EPS の保湿能。

Material	Moisture retention capacity (%)
S-2 EPS	79±12
SF-3 EPS	80±11
SM-1 EPS	57±17
ATCC53968 EPS	63±19
Hyaluronic acid	36±7.0
Urea	0.0±0.0
Glycerol	7.8±5.3
Silica gel	27±6.0

表 4. S-2 EPS の保湿能に関与する構造。

EPS	Moisture retention capacity (%)
S-2 EPS	79±12
DeAcyl S-2 EPS	4.0±6.0
ReAcyl S-2 EPS	>100 ^a

^a 水添加直後の重量より増加。

高い保湿能を示した (表 3)^{36,37)}。同様に、吸湿能についても高い能力を示した。そこで、EPS 分子の構造と保湿能との関係について検討するため、S-2 EPS に含まれる脂肪酸に注目し、脂肪酸が保湿能に与える影響を検討した。その結果、S-2 EPS の脂肪酸を除去することで、保湿能の著しい減少が認められた (表 4)。これに対して、脂肪酸を除去したのちにパルミチン酸を付加しなおした EPS では、この相対湿度条件下では、添加した水を保持するだけでなくさらに吸湿するほど保湿能が回復した。従って、保湿能には脂肪酸エステルをもつことが重要であると予想された。

ここまで、*Rhodococcus* 属細菌の生産する EPS には、強い界面活性能や保湿能をもつものがあることを示した。これらの機能は高分子の多糖が脂肪酸のような糖質以外の修飾を受けることで付与されることが示唆された。そこで、この EPS をモデルとして、様々な多糖に対して人工的に脂肪酸をエステル結合させることにより、高い界面活性能や保湿能を付与することができるかを検討した。合成には、酸性多糖としてカルボキシメチルセルロースとアルギン酸、中性多糖としてデキストランとグアーガムを用いた。これらは、そのままでは石油乳濁化能は認められなかったが、脂肪酸を付加した結果、付加率は重量%にしてごくわずかであっても、酸性の多糖において石油乳濁化能が付与された。

さらに、合成したアシル化多糖について保湿能を測定した結果、酸性基が主鎖の糖 2 残基の一つ程度に存在するカルボキシメチルセルロースでは、保湿能の上昇が認められた (表 5)。しかし、すべての糖残基に酸性基が存在するアルギン酸や、中性多糖であるデキストラン、グアーガムでは、脂肪酸の付加による保湿能の上昇は認められなかった。脂肪酸をもつことで強い保湿能を示した S-2 EPS の糖鎖は、糖 4 残基に酸性基が 1 つ存在していることから、糖鎖に適度に酸性基が存在する多糖に

表 5. アシル化多糖の保湿能。

Material	Moisture retention capacity (%)
CM-cellulose	49±7.0
Palmitoylated CM-cellulose	84±6.0
Alginic acid	49±17
Palmitoylated alginic acid	37±7.0
Dextran	21±11
Palmitoylated dextran	12±3.0
Guar gum	43±14
Palmitoylated guar gum	0.0±0.0

対しては、脂肪酸を付加することにより保湿能が向上することが示唆された。

4. おわりに

Rhodococcus 属細菌の生産する EPS は、様々な炭化水素に対する耐性や分解に関与し、また、界面活性能や保湿能ももっていた。これら EPS の構造を決定した結果、脂肪酸やピルビン酸を含む新規の糖鎖構造をもつ酸性多糖であり、分子内に親水性領域や疎水性領域、酸性領域などが混在する polyphilic な高分子化合物であることを明らかにした。さらに、これら機能と構造との関係を検討した結果、EPS は脂肪酸やピルビン酸のような糖質以外の修飾を受けることにより、複数の機能を付与されることが示唆された。近年、ポリエチレン分解能をもつ *Rhodococcus ruber* C208 が、ポリエチレン表面に多糖を主要構成成分としたバイオフィルムを形成することにより、ポリエチレン分解が起こることが報告されてきており^{23,30)}、興味深い。EPS は微生物細胞の最外層として位置し、微生物とそれを取り巻く環境との相互作用に関わる重要な因子として考えられることから、今後、EPS の機能と構造との関係をより詳細に解析することで、自然環境中における *Rhodococcus* 属細菌の動態と、他の細菌との関わりを理解することができると考えている。また、環境負荷の少ない機能性バイオポリマーとして、多機能な EPS およびそれをモデルとした半合成ポリマーを幅広い産業へ応用できると考えている。

謝 辞

本研究は、日本大学生物資源科学部応用生物科学科分子微生物学研究室中嶋睦安先生、砂入道夫先生、岩淵範之先生及び同研究室の相澤朋子博士、吉崎弘修士、同学部農芸化学科の荻原淳先生、同大学短期大学部の安齋寛先生、New South Wales 大学の Brett Neilan 先生、Iain Couperwhite 先生並びに株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 (現所属: 独立行政法人製品評価技術基盤機構) の原山重明先生との共同研究であり、ここに深謝いたします。また、本研究の多くは同学部生命科学研究セ

ンターで行われたものであり、同センターの別府輝彦先生、上田賢志先生に心から感謝いたします。本研究は21世紀COEプログラム「微生物共生系に基づく新しい資源利用開発」の一環としておこなわれたものである。

文 献

- Aizawa, T., N. Iwabuchi, A. Kikuchi, M. Urai, H. Anzai, M. Sunairi, and M. Nakajima. 2001. A rapid and simple method using the detergent Triton X114 for preparation of outer membrane proteins from bacteria containing mycolic acids. *Actinomycetologica* 15: 6–10.
- Aizawa, T., B. Neilan, I. Couperwhite, M. Urai, H. Anzai, N. Iwabuchi, M. Nakajima, and M. Sunairi. 2005. Relationship between extracellular polysaccharide and benzene tolerance of *Rhodococcus* sp. 33. *Actinomycetologica* 19: 1–6.
- Asturias, J.A., and K.N. Timmis. 1993. Three different 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes in the gram-positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Bacteriol.* 175: 4631–4640.
- Bell, K.S., J.C. Philp, D.W. Aw, and N. Christofi. 1998. The genus *Rhodococcus*. *J. Appl. Microbiol.* 85: 195–210.
- Brennan, P.J., and H. Nikaido. 1995. The envelope of *Mycobacteria*. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 29–63.
- Davey, M.E., and G.A. O’toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Boil. Rev.* 64: 847–867.
- Finnerty, W.R. 1992. The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 193–218.
- Goodfellow, M. 1989. Nocardioform actinomycetes. Genus *Rhodococcus*. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
- Harayama, S., K. Venkateswaren, H. Toki, S. Komukai, M. Goto, H. Tanaka, and M. Ishihara. 1996. Degradation of crude oil by marine bacteria. *J. Mar. Biotechnol.* 3: 239–243.
- Iwabuchi, N., M. Sunairi, H. Anzai, H. Morisaki, and M. Nakajima. 2003. Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 30: 51–60.
- Iwabuchi, N., M. Sunairi, H. Anzai, M. Nakajima, and S. Harayama. 2000. Relationships between colony morphotypes and oil tolerance in *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5073–5077.
- Iwabuchi, N., M. Sunairi, M. Urai, C. Itoh, H. Anzai, M. Nakajima, and S. Harayama. 2002. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2337–2343.
- Kosono, S., M. Maeda, F. Fuji, H. Arai, and T. Kudo. 1997. Three of the seven *bphC* genes of *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem, are located on an indigenous plasmid associated with biphenyl degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3282–3285.
- Lang, S., and J.C. Philp. 1998. Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74: 59–70.
- Larkin, M.J., L.A. Kulakov, and C.C. Allen. 2005. Biodegradation and *Rhodococcus*: masters of catabolic versatility. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 282–290.
- Leitch, R.A., and J.C. Richards. 1990. Structural analysis of the specific capsular polysaccharide of *Rhodococcus equi* serotype 1. *Biochem. Cell. Biol.* 68: 778–789.
- Lichtinger, T., G. Reiss, and R. Benz. 2000. Biochemical identification and biophysical characterization of a channel-forming protein from *Rhodococcus erythropolis*. *J. Bacteriol.* 182: 764–770.
- Lindberg, B. 1990. Components of bacterial polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 48: 279–318.
- Masai, E., A. Yamada, J.M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, and K. Yano. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2079–2085.
- Masoud, H., and J.C. Richards. 1994. Structural elucidation of the specific capsular polysaccharide of *Rhodococcus equi* serotype 7. *Carbohydr. Res.* 252: 223–233.
- Minnikin, D.E. 1991. Chemical principles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelope. *Res. Microbiol.* 142: 423–427.
- Nishiuchi, Y., T. Baba, and I. Yano. 2000. Mycolic acids from *Rhodococcus*, *Gordonia*, and *Dietzia*. *J. Microbiol. Methods* 40: 1–9.
- Orr, I.G., Y. Hadar, and A. Sivan. 2004. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 97–104.
- Paje, M.L., B.A. Neilan, and I. Couperwhite. 1997. A *Rhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene. *Microbiology* 143: 2975–2981.
- Richards, J.C. 1994. Stereochemical aspects of the antigenic determinants of bacterial polysaccharides: the *Rhodococcus equi* capsular polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* 25: 253–267.
- Roberts, I.S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 285–315.
- Severn, W.B., and J.C. Richards. 1992. The acidic specific capsular polysaccharide of *Rhodococcus equi* serotype 3. Structural elucidation and stereochemical analysis of the lactate ether and pyruvate acetal substituents. *Can. J. Chem.* 70: 2664–2676.
- Severn, W.B., and J.C. Richards. 1990. Structural analysis of the specific capsular polysaccharide of *Rhodococcus equi* serotype 2. *Carbohydr. Res.* 206: 311–332.
- Severn, W.B., and J.C. Richards. 1999. The structure of the specific capsular polysaccharide of *Rhodococcus equi* serotype 4. *Carbohydr. Res.* 320: 209–222.
- Sivan, A., M. Szanto, and V. Pavlov. 2006. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 346–352.
- Sunairi, M., N. Iwabuchi, Y. Yoshizawa, H. Murooka, H. Morisaki, and M. Nakajima. 1997. Cell-surface hydrophobicity and scum formation of *Rhodococcus rhodochrous* strains with different colonial morphologies. *J. Appl. Microbiol.* 82: 204–210.
- Sutcliffe, I.C. 1998. Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74: 49–58.
- Sutherland, I.W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147: 3–9.
- Urai, M., T. Aizawa, H. Anzai, J. Ogihara, N. Iwabuchi, B. Neilan, I. Couperwhite, M. Nakajima, and M. Sunairi. 2006. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by a benzene tolerant bacterium, *Rhodococcus* sp. 33. *Carbohydr. Res.* 341: 616–623.
- Urai, M., H. Anzai, J. Ogihara, N. Iwabuchi, S. Harayama, M. Sunairi, and M. Nakajima. 2006. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2. *Carbohydr. Res.* 341: 766–775.
- Urai, M., H. Anzai, N. Iwabuchi, M. Sunairi, and M. Nakajima. 2002. A novel moisture-absorbing extracellular polysaccharide from *Rhodococcus rhodochrous* SM-1. *Actinomycetologica* 16: 26–31.
- Urai, M., H. Anzai, N. Iwabuchi, M. Sunairi, and M. Nakajima. 2004. A novel viscous extracellular polysaccharide containing fatty acids from *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 53968. *Actinomycetologica* 18: 15–17.
- Urai, M., H. Yoshizaki, H. Anzai, J. Ogihara, N. Iwabuchi, S. Harayama, M. Sunairi, and M. Nakajima. 2007. Structural

- analysis of an acidic, fatty acid ester-bonded extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. Carbohydr. Res. 342: 933–942.
- 39) Urai, M., H. Yoshizaki, H. Anzai, J. Ogihara, N. Iwabuchi, S. Harayama, M. Sunairi, and M. Nakajima. 2007. Structural analysis of mucoidan, an acidic extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. Carbohydr. Res. 342: 927–932.
- 40) van der Geize, R., and L. Dijkhuizen. 2004. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. Curr. Opin. Microbiol. 7: 255–261.
- 41) Wakayama, Y., M. Nakajima, and H. Murooka. 1980. Isolation and characterization of S and R strains of *Nocardia* sp. CF222. Bull. Coll. Agr. Vet. Med. Nihon Univ. 37: 99–105.
- 42) Warhurst, A.M., and C.A. Fewson. 1994. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. Crit. Rev. Biotechnol. 14: 29–73.
- 43) Watnick, P., and R. Kolter. 2000. Biofilm, city of microbes. J. Biotechnol. 182: 2675–2679.
- 44) Whyte, L.G., J. Hawari, E. Zhou, L. Bourbonniere, W.E. Inniss, and C.W. Greer. 1998. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2578–2584.