

芳香族ニトロ化合物を分解する *Rhodococcus* 属細菌の バイオテクノロジー

Rhodococcus Biotechnology in Biodegradation of Nitroaromatic Compounds

木 村 信 忠
NOBUTADA KIMURA

独立行政法人産業技術総合研究所生物機能工学研究部門生物資源情報基盤研究グループ

〒 305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6

TEL: 029-861-8767 FAX: 029-861-6587

E-mail: n-kimura@aist.go.jp

Microbial and Genetic Resources Research Group, Institute for Biological Resources & Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

キーワード: *Rhodococcus* 属細菌, 芳香族ニトロ化合物, 環境汚染, バイオレメディエーション, 微生物分解

Key words: *Rhodococcus*, nitroaromatic compound, environmental pollution, bioremediation, microbial degradation

(原稿受付 2007 年 5 月 16 日 / 原稿受理 2007 年 5 月 23 日)

1. はじめに

これまでの研究から *Rhodococcus* 属細菌は多様な化合物に対する生分解性を有しており, 環境中の物質循環において重要な役割を果たしていることが推定されている。この性質を環境バイオテクノロジーへ資することを目的とした研究が盛んに行われており, 有害化合物による汚染を浄化する「バイオレメディエーション」への応用が期待されている。また, *Rhodococcus* 属細菌に関する研究は, 応用的な側面のみならず, 微生物が如何に化合物に対する分解能力を獲得するのかという基礎的な面においても大変の興味深い分野である。

これまでの研究において, *Rhodococcus* 属細菌は芳香族ニトロ化合物に対して高い分解能力を有することが明らかにされ, 化合物の分解機構に関する研究が行われている。芳香族ニトロ化合物は環境中に拡散し, 環境問題を引き起こしている。例えば, パラチオンや EPN (*O*-Ethyl-*O*-*p*-nitrophenyl phenylphosphonate) などの農薬は, 環境中で加水分解されてニトロフェノールへと変換されている^{6,7,35,42)}。これらの農薬が盛んに利用されていた 1960 年代には, 土壌中にニトロフェノールが蓄積される環境汚染を引き起こした。発展途上国において, これらの農薬は現在も使用されている。ニトロフェノールはまた医薬品や染料の原料として利用され, この化合物は低濃度に希釈された場合でも鮮やかな黄色を呈色するために, 合成工場より排出される廃水の管理には特別な配慮が必要になっている。

2,4,6-トリニトロトルエン (TNT) や 2,4,6-トリニトロフェノール (ピクリン酸) などは爆薬として利用されている。環境中に拡散した化合物は長期間残留している

ことから, 難分解性化合物として知られている。米国内における TNT による環境汚染サイトの調査結果は EPA (Environmental Protection Agency) より公開されている³⁾。最も深刻に汚染されているサイトの多くは陸軍の弾薬庫内であり, すでに浄化作業が開始されている。しかし, 地下水の汚染状況に関する情報は公開されておらず, 化合物の拡散による二次汚染が懸念されている。

これらの芳香族ニトロ化合物は発ガン性などの生物毒性を示すことが知られており, 環境浄化が急務の課題となっている。米国やドイツにおいては, 爆薬に汚染されたサイトの浄化が最も取り組まれている課題であり, 物理的・化学的手法を利用した浄化プロセスが開発されている。一方, 微生物を利用した「バイオレメディエーション」による原位置処理はコストが比較的安く, 環境バイオ技術による汚染浄化が期待されており, バイオレメディエーション技術に資する微生物の研究が開始されている。本稿では, 著者らが進めているニトロフェノールの微生物分解の研究を中心に, *Rhodococcus* 属細菌による代表的な芳香族ニトロ化合物の微生物分解に関する研究成果について紹介する。

2. 芳香族ニトロ化合物の微生物分解

微生物分解が報告されている代表的な芳香族ニトロ化合物を図 1 に示した。微生物による芳香族ニトロ化合物の分解メカニズムは, 次のように分類できる^{1,8-10,15-17, 19-21,23,31,33,34,36,38,39,41,43-47,50,52,53,57)}。

- 1) Monooxygenase による分解: 2-Nitrophenol, 4-Nitrophenol, 4-Nitroanisole
- 2) Dioxygenase による分解: Nitrobenzene, 2-Nitro-

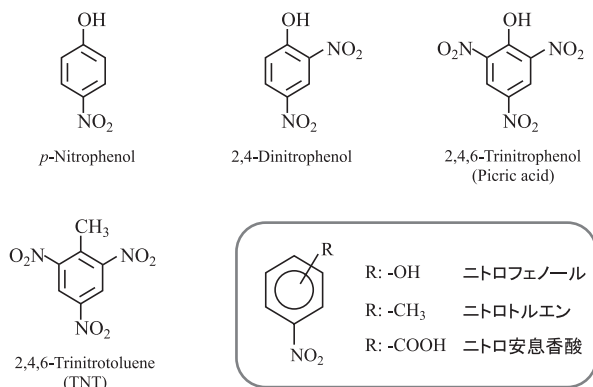


図1. 代表的な芳香族ニトロ化合物。

toluene, 3-Nitrobenzoate, 1,3-Dinitrobenzene, 2,6-Dinitrophenol

- 3) Reductase による分解: 2,4-Dinitrophenol, 2,4,6-Trinitrophenol
- 4) Mutase による分解: Nitrobenzene, 3-Nitrophenol, 2-Chloro-5-nitrophenol, 4-Chloronitrobenzene
- 5) Hydroxylaminolyase による分解: 4-Nitrotoluene, 4-Nitrobenzoate, 3-Nitrophenol

分解菌は芳香族ニトロ化合物を資化する場合(炭素源, または窒素源として利用する場合)と共代謝により分解する例がある。化合物は好気性菌により, 好気条件下で酸素分子が導入されることで分解される場合と, 嫌気条件下で還元的に代謝される場合がある。

また, 異なる化合物に対する複数の分解経路を有する菌株がある。例えば, *Rhodococcus opacus* SAO101 株は 2,4-Dinitrophenol, および *p*-Nitrophenol を共に分解できる (Unpublished data)。芳香族ニトロ化合物を分解する微生物の遺伝生化学的研究が行われており, 特にニトロベンゼンやニトロトルエン分解菌に関する研究が積極的に取り組まれ, 分解遺伝子の同定や分解酵素である Dioxygenase のタンパク質結晶構造の解明など, 知見が蓄積している¹³⁾。

3. *Rhodococcus* 属細菌による微生物分解

3.1. ニトロフェノール

3.1.1. パラニトロフェノール (PNP)

PNP はフェノールのパラ位をニトロ基で置換した物質で, 農薬, 医薬品, 染料などの原料として利用されており, 日本における年間生産量は約 100 t と推定されている²²⁾。これらは原材料加工施設やその使用施設の廃水から環境中に放出され, また, 農薬として散布される有機リン化合物の加水分解産物として生じることが知られている。

芳香族化合物におけるニトロ基は共鳴構造をとり, 酸素原子は窒素原子よりも負に帯電しているため, 酸素-窒素結合は部分的に正電荷をおびる。そのためニトロ基は求電子的作用を示し, 生物的反応においては, ニトロ基の還元が一般に起こりやすい。非生物的には鉄などの金属が還元剤としてニトロ基に作用する。ニトロ基の還元過程において生成するニトロソ基, ヒロドヒシルアミ

ノ基などは反応性が高く, 生体分子と相互作用するため, より高い毒性, 発ガン性, 変異原性を示すことが知られている。

また, PNP を含むニトロフェノール類は, 脱共役剤 (アンカップラー) と呼ばれ, 細胞の酸化リン酸化を阻害することが知られている。好気性生物は, 有機物を分子状酸素により酸化して得られるエネルギーをミトコンドリア内膜や微生物細胞膜などの膜を隔てた水素イオンの電気化学ポテンシャルの差として貯えている。しかし, 脱共役剤は脂溶性弱酸であり, 酸型も解離型も生物細胞の脂質二重膜を受動的拡散によって通過できるため, 膜に生じた水素イオンの電気化学ポテンシャル差が失われるまで水素イオンを運び出してしまふ。結果として, 電気化学ポテンシャルを利用する ATP 合成系を阻害することになり, PNP が生物に対して有害であると指摘されている。

ラット, マウスに対する PNP の LD₅₀ (経口) はそれぞれ 350, 467 mg/kg であり, 微生物に対しては, 一般的に 500 μM 以上 (70 mg/L) で生育を阻害することが報告されている³²⁾。また各種微生物機能も, PNP によって影響を受けることが指摘されている^{11,14)}。アメリカの Environmental Protection Agency (EPA) は, PNP を優先的に処理すべき汚染物質に指定し, 自然水中の濃度を 10 μg/l 以下に保つことを定めている。

現在までに *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* 属細菌などの PNP 分解菌の分離が報告されている^{5,18,20,21,37,40)}。

PNP 分解菌に関する初期の研究は, 1953 年の Simpson らによる PNP を hydroquinone に変換し NO₂⁻ を生成する好気性の *Pseudomonas* 属細菌の報告である⁴⁹⁾。PNP 分解経路は 1990 年代に Spain らによってその詳細が明らかにされた^{50,51)}。彼らは PNP を唯一炭素源として生育する *Moraxella* sp. を活性汚泥より分離し, PNP の分解過程において検出される中間代謝産物を解析した。その結果, PNP は Monooxygenase 活性によって *p*-Benzoquinone に酸化され, 続いて Quinone reductase によって Hydroquinone に還元されることを推定し, この Hydroquinone は γ -Hydroxymuconic semialdehyde, Maleylacetate を経て, 資化されていることを示唆した (図 2)。

これに対して Kadiyala らは, 上述の例と異なった経路で PNP を分解する菌株 *Bacillus sphaericus* JS905 を分離し, この菌株から新規の PNP monooxygenase を精製した¹⁰⁾。この酵素は粗酵素抽出液の可溶性画分より分離され, PNP 分解経路の初期段階において PNP を 4-Nitrocatechol に変換する反応と, 4-Nitrocatechol を Hydroxyquinol に変換する反応を触媒する。

現在までに報告されている PNP 分解菌の分解経路は, 好気性の微生物では上述の Hydroquinone 経由と 4-Nitrocatechol 経由の 2 種類が報告されている。Hydroquinone 経由の分解経路は, グラム陰性菌に多く見られるが, 両方の分解経路を持つ菌株も報告されている。Hanne らが分離した *Nocardia* sp. は, 誘導物質として PNP を添加すると Hydroquinone 経由で PNP を分解し, 誘導物質としてフェノールを添加すると 4-Nitrocatechol 経由で PNP を分解することを報告している¹⁸⁾。

嫌気性微生物の研究において, Gorontzy らにより

PNP のニトロ基を還元し *p*-Aminophenol に変換する *Desulfovibrio gigas* や *Clostridium pasteurianum* などの数種類の菌株が報告されている¹⁴⁾。また、Boyd らの研究によって、嫌気条件下の活性汚泥中における PNP は、微生物によって CH₄、CO₂ まで分解されることが確認されているが、この分解経路の詳細は明らかではない⁴⁾。

このように、微生物による PNP 分解に関する研究は長年行われてきたが、分子遺伝学的な知見は限られていた。そこで著者らは、PNP 分解機構の解明に取り組んできた。日本の南西諸島の土壌から分離した *Rhodococcus opacus* SAO101 株は、PNP を含む各種芳香族化合物を分解・資化する性質を示す²⁷⁾。SAO101 株による PNP 推定分解経路は図 2 に示す通りである。本経路では、PNP は 4-Nitrocatechol, Hydroxyquinol を経て、Maleylacetate に変換され、最終的に分解代謝産物は TCA 回路により異化される。

これまでの研究で、SAO101 株から PNP 分解に直接

関与する 3 つの酵素遺伝子 (*NpcA*, *NpcB*, *NpcC*) を分離し、遺伝子および遺伝子産物の解析を行った(図 3)²⁸⁾。PNP monoxygenase は、PNP へ 1 分子の酸素を導入して 4-Nitrocatechol を生成する。さらに、PNP monoxygenase は 4-Nitrocatechol を Hydroxyquinol へ変換する反応を触媒する。PNP monoxygenase は、2 つのコンポーネント (*NpcA*, *NpcB*) からなる酵素で、*NpcA* はクロロフェノール酸化酵素 (2,4,6-Trichlorophenol monoxygenase) と 44% の相同性、*NpcB* はフェノール酸化酵素 (Phenol 2-hydroxylase) と 32% の相同性を示す。また、PNP monoxygenase の基質特異性の検討を行い、2,4,6-Trichlorophenol を酸化分解するが、2,4,6-Nitrophenol に対する分解活性は認められなかった。一方、Hydroxyquinol 1,2-dioxygenase (*NpcC*) は、Hydroxyquinol へ 2 分子の酸素を導入して芳香環を開裂して Maleylacetate を生成する。*NpcC* は *Arthrobacter* sp. strain BA-5-17 由来の Hydroxyquinol 1,2-dioxygenase と 76% の相同性を示す。

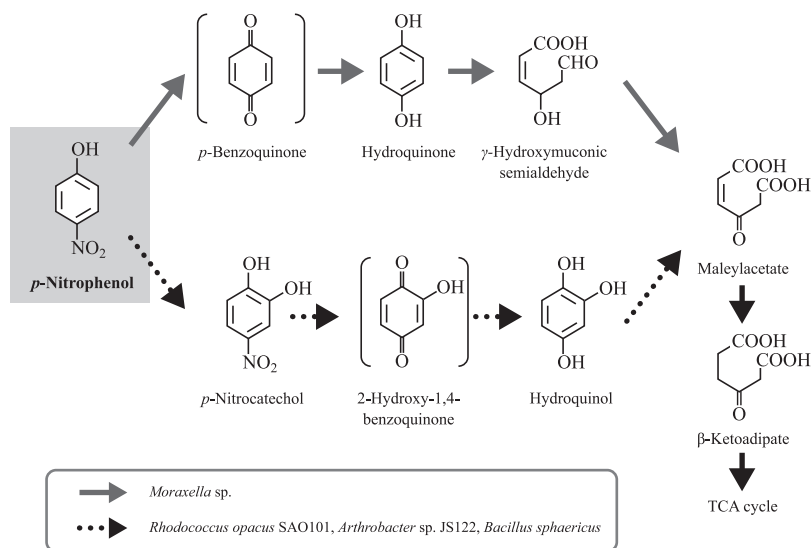


図 2. PNP の推定分解経路。

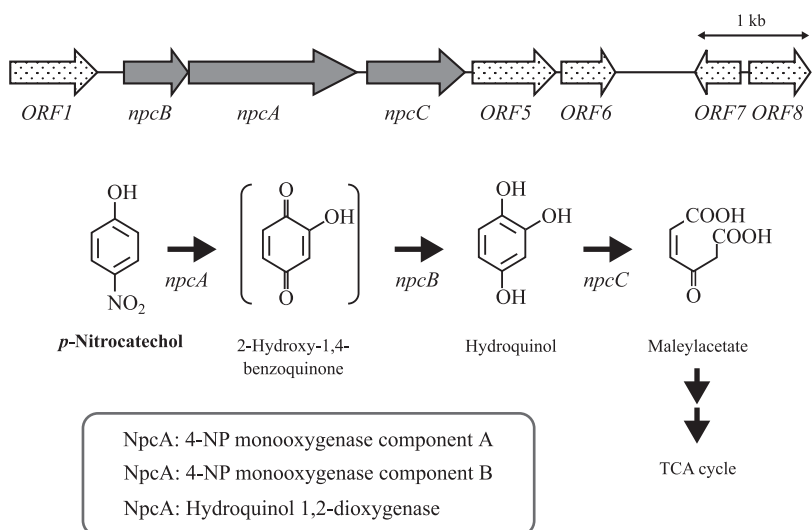


図 3. *R. opacus* SAO101 由来の PNP 分解遺伝子群。

ところで、*Rhodococcus* 属細菌の細胞内に、巨大な線状プラスミドが内在している例が報告されており、化合物の分解代謝に関わる遺伝子の獲得や水平伝搬に関与していることが確認されている²⁴⁾。SAO101 株には3つの巨大な線状プラスミドが内在しており、ジベンゾフラン分解遺伝子を含む各種化合物の分解遺伝子が存在している。しかし、PNP 分解遺伝子のゲノム上の存在する位置を調べたところ、分解遺伝子は染色体 DNA 上に存在していることが明らかとなった。これは、PNP 分解遺伝子は *Rhodococcus* 属細菌のゲノム上に保存されており、この細菌と共進化している可能性を示唆している。

さらに、著者らは PNP により馴養したリアクターから分解菌を分離し、系統学および生化学的性質について検討を行った⁴⁸⁾。フェノールをはじめ芳香族化合物を処理するリアクター内には性質の異なる分解菌がコミュニティを形成している例が報告されている。PNP 処理リアクター内の分解菌を解析したところ、系統学的に異なる3種類の分解菌 (*Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*) が分離された。分離した菌株間において PNP 分解能力に相違が確認され、特に *Pseudomonas putida* YTK17 株は 100 μM PNP 濃度で前培養した際に高い分解能力を示したが、*Rhodococcus opacus* YTK32 株は比較的高い 300 μM PNP 濃度で前培養した際に高い分解能力を示した。このことから PNP を処理するリアクター内においても、性質の異なる分解菌がコミュニティを形成している可能性が示唆された。

3.1.2. 2,4-ジニトロフェノール (24DNP)

24DNP はフェノールのオルト位、パラ位をニトロ基で置換した物質で、医薬品、染料、防腐剤などの原料として利用されている。また、脱共役剤 (アンカップラー) としても知られており、*Escherichia coli*, *Tetrahymena*, 酵母, 植物に対して生物毒性を示すことが知られている。LD₅₀ 値は 30 mg/kg であり、類縁化合物である 2,4,6-トリニトロフェノールよりも高い毒性を示す。長期間にお

ける 24DNP への暴露は、皮膚や眼、骨、中枢神経に損傷を与えることが明らかとなっている。さらに、24DNP は難分解物質であることから、EPA により毒劇物に指定されている。

現在までに報告されている 24DNP を分解する微生物は、一つの例外 (Heiss らが 24DNP を窒素源として利用する *Janthinobacterium* 属細菌を分離した) を除いて、すべて高 G+C グラム陽性細菌に属している¹⁹⁾。著者らは各地の土壌、汚泥から 24DNP 分解菌の分離と系統学的な解析を行い、分離した全ての菌は *Rhodococcus* 属細菌であるという結果を得ている²⁶⁾。また、24DNP を処理するリアクター内の微生物相解析を行い、*Rhodococcus* 属細菌は 24DNP を処理する微生物として優占化していることを明らかにした²⁵⁾。

現在までに分離された 24DNP を分解する微生物が、*Rhodococcus* 属細菌を含む高 G+C グラム陽性細菌に属している理由については明らかになっていない。一説によると、分離された微生物は 24DNP の生物毒性へ高い耐性を有することが原因ではないかと考えられている。そこで著者らは、24DNP に対する *E. coli*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus erythropolis* の耐性について検討を行った。対数増殖期に達した菌体培養液に 200, 400, 500, 600, 800, 1000 μM 24DNP を添加した際の増殖阻害について検討を行った。結果として *E. coli*, *Pseudomonas putida* へ化合物を添加した際には、著しく菌の増殖が阻害されたことに比べて、*R. erythropolis* の増殖阻害の割合は低いことを確認することができた (Unpublished data)。

24DNP 分解機構についても研究が行われている。Heiss らは、ピクリン酸分解菌として分離された *R. erythropolis* HL PM-1 が、水素イオンを求核的付加反応によって 24DNP へ導入し、H-2,4-Dinitrophenol を経由して、4,6-Dinitrohexanoic acid を生成することを報告している^{29,44)}。HL PM-1 株由来の 24DNP 分解遺伝子の分

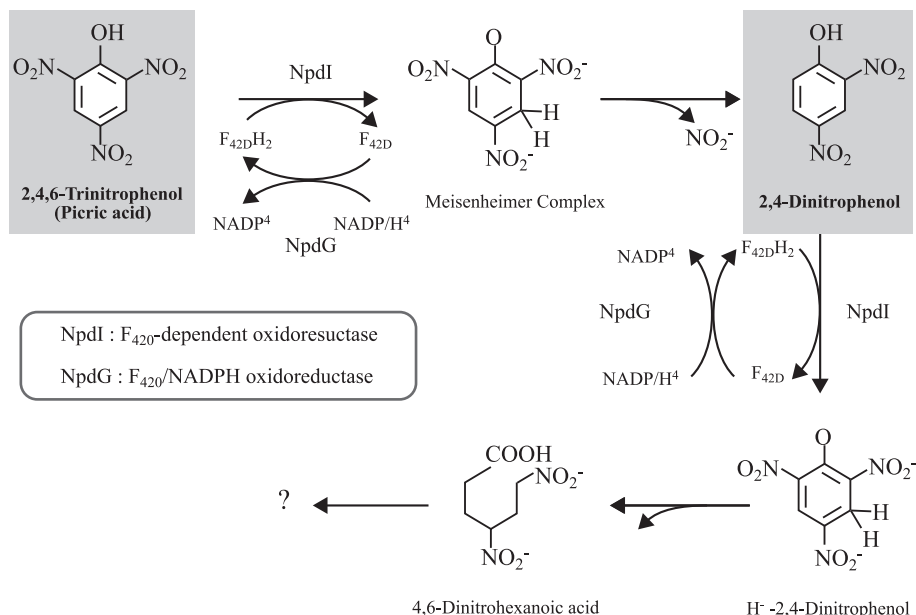


図 4. ピクリン酸および 2,4-DNP の推定分解経路。

離は Differential display 法により行われ、24DNP 分解に関わる 6 種類の遺伝子が同定された⁵⁵⁾。それによると、24DNP から H-2,4-Dinitrophenol へ変換する反応には、F₄₂₀-dependent reductase (NpdI) が触媒することを明らかにしている。また、この酵素はピクリン酸から Hydride-Meisenheimer complex へ変換する反応も触媒することが明らかになっている。相同性解析の結果から、この酵素は *Methanobacterium thermoautotrophicum* の生産する酵素と相同性があることが判明している。これは微生物による 24DNP 分解機構の獲得がいかにして行われたか、分子進化学的に興味を持たれる結果である。

一方、下流の代謝経路については、現在も知見が得られていない。上述のように HL PM-1 株が 24DNP から 4,6-Dinitrohexanoic acid へ分解するという結果を示しているが、下流代謝経路については不明である²⁹⁾。一方、Blasco らのグループは、*Rhodococcus opacus* による 24DNP 分解産物として 3-Nitroadipate を同定しており、24DNP は還元反応によって 3-Nitroadipate へ代謝されて、TCA 回路にて異化されるという説を提唱している²⁾。今後更なる研究が必要であろう。

3.1.3. 2,4,6-トリニトロフェノール (ピクリン酸)

爆薬の原料として知られ、第一次世界大戦まで日本海軍における爆薬製造の主要な原料として利用されていた。現在は、染料合成工場がピクリン酸をアゾ染料の供給原材である Picramic acid (2-Amino-4,6-dinitrophenol) の原材料として利用している。ピクリン酸への暴露は、炎症、アレルギーを発症し、長期間の暴露は赤血球や肝臓、腎臓へダメージを与えて健康への影響を及ぼす。このような性質からピクリン酸は EPA により毒劇物に指定されている。

現在までに報告されているピクリン酸を分解する微生物は、*Rhodococcus*, *Nocardioidea* 属細菌であり、すべて高 G+C グラム陽性細菌に属している^{1,9,29,30)}。ピクリン酸の微生物分解は水素イオンが求核的付加反応によってピクリン酸へ導入することで開始される (図 4)。生成した H-Picric acid (Hydride-Meisenheimer complex) は、ニトロ基の除去により 24DNP を生成する。この反応は、24DNP から H-2,4-Dinitrophenol への変換に関わる酵素と同じ F₄₂₀-dependent reductase (NpdI) によって触媒される。従って、24DNP 分解菌である *R. erythropolis* HL PM-1 株は 24DNP とピクリン酸を分解することができる。

ところで、著者らが分離した 24DNP 分解菌は系統的に 2 種類 (*Rhodococcus opacus*, *Rhodococcus erythropolis*) に分類された。また、分離した 2 種類の微生物は機能的に異なっており、*R. erythropolis* D3213 株はピクリン酸を構造的に分解するが、*Rhodococcus opacus* SNK104 株は 24DNP によって分解酵素が誘導されることでピクリン酸へ分解能力を示す。しかし、ピクリン酸により分解酵素が誘導されることは無く、遺伝子発現の調節システムの存在が示唆される²⁶⁾。

3.2. ニトロトルエン

2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) はもっとも有名な爆薬の一種である。第二次世界大戦中に大量に生産され、60 年以上経過した現在に至っても、高濃度の化合物が環境

中に残存することが報告されている。そのことから分かるように、TNT は生分解性が非常に低い。また、ヒトや動物、微生物に対して高い毒性を示すことが知られている⁵⁶⁾。

TNT は強い電子受容体であることから、酸素による親電子的な酸化反応は起こりにくい。そのことから、モノまたはジニトロ化合物が微生物の初期酸化反応によって分解が開始されるのに対して、TNT は微生物の初期酸化反応によって分解された例が現在までに報告されていない。

TNT を処理するための一般的な方法は土壌の回収、焼却による処分である。しかし、この方法は運送費や設備費などに多額の費用を必要とすることから、比較的成本が安いバイオレメディエーション技術の発展が期待されている。しかしながら、現在までに TNT を唯一のエネルギー源として生育できる微生物の分離は報告されていない。従って、分解微生物を現場で利用する場合には、分解微生物を維持するために処理現場へ栄養源を添加する必要があり、コストパフォーマンスに問題が残っている。そこで、バイオレメディエーションの効率化へ向けて、遺伝生化学的研究を含む分解微生物の基礎研究が展開されている。

TNT を分解する微生物として、*Rhodococcus*, *Pseudomonas* 属細菌が現在までに報告されている (図 5)。*Pseudomonas* sp. strain JLR121 は嫌気条件下において TNT を唯一の窒素源として利用する¹²⁾。また、JLR121 株は TNT を最終電子受容体として利用することから、嫌気条件下における TNT を分解する例として知られている。

一方、ピクリン酸分解菌として分離された *R. erythropolis* HL PM-1 は TNT をコメタボリズムによって分解する。HL PM-1 株は水素イオンが求核的付加反応によってピクリン酸の 3 位へ導入し、橙黄色の化合物 (Hydride-Meisenheimer complex) を経由して、2,4-ジニトロトルエンを生成する酵素を有している⁵⁵⁾。Vorbeck らは、HL PM-1 株が TNT から Hydride-Meisenheimer complex (H-TNT) を経て、Protonated dihydride-Meisenheimer complex of TNT (2H-TNT) を生成することを明らかにした⁵⁴⁾。しかしながら、HL PM-1 株は TNT を窒素源、または炭素源として利用することはできない。

4. おわりに

以上述べてきたように、芳香族ニトロ化合物の微生物分解に関する研究が進められており、すでに蓄積された知見をどのように環境浄化へ応用するか検討する段階にきている。米国においては、すでにニトロトルエンの分解処理を中心にバイオレメディエーションが開始されている。また、紛争地域に放置された地雷には TNT が含まれており、その検出と浄化は今後の研究対象となるものと予想される。著者らは芳香族ニトロ化合物分解菌の機能を利用したバイオセンサーの研究に取り組んでおり、今後は環境浄化や環境モニタリングへの利用に向けた研究を行いたいと考えている。

さらに、芳香族ニトロ化合物の微生物分解に関する研究から、*Rhodococcus* 属細菌は芳香族ニトロ化合物の生

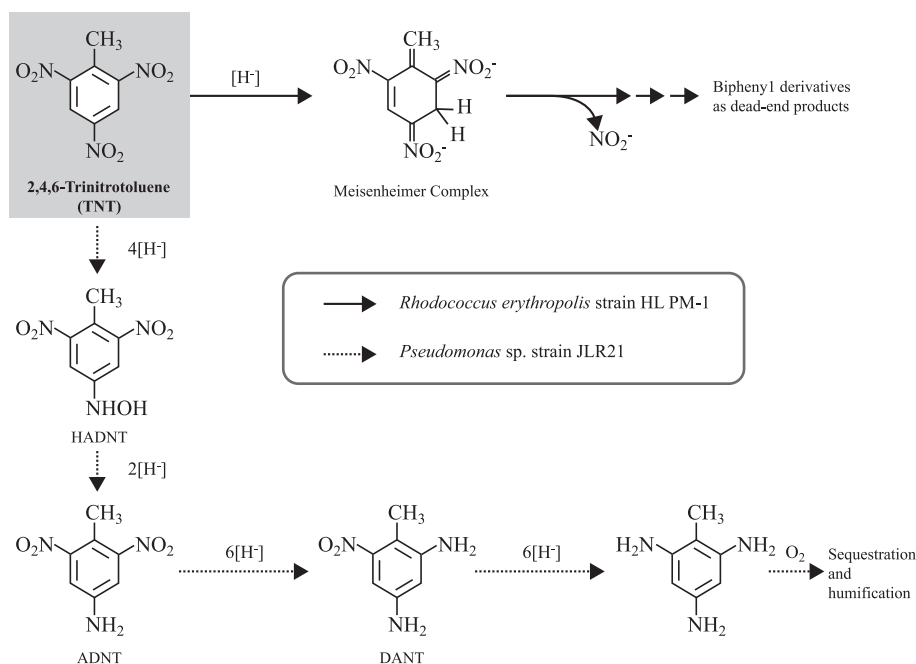


図5. TNTの推定分解経路。

HADNT: Hydroxylamino dinitrotoluene, ADNT: Amino dinitrotoluene, DANT: Diamino dinitrotoluene.

分解に密接に関与していることが明らかにされた。しかしながら、分解機構の詳細については不明な点が残されており、それを理解するためには分解経路やそれに関わる遺伝子や酵素の性質など、さらなる検討が必要であろう。

文 献

- Behrend, C., and K. Heesche-Wagner. 1999. Formation of hydride-Meisenheimer complexes of picric acid (2,4,6-trinitrophenol) and 2,4-dinitrophenol during mineralization of picric acid by *Nocardioideis* sp. strain CB 22-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1372–1377.
- Blasco, R., E. Moore, V. Wray, D. Pieper, K. Timmis, and F. Castillo. 1999. 3-nitroadipate, a metabolic intermediate for mineralization of 2,4-dinitrophenol by a new strain of a *Rhodococcus* species. *J. Bacteriol.* 181: 149–152.
- Border, M.F., and R.A. Westmoreland. 1998. An estimate of soils contaminated with secondary explosives. U.S. Army Environmental Center.
- Boyd, S.A., D.R. Shelton, D. Berry, and J.M. Tiedje. 1983. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 50–54.
- Bruhn, C., H. Lenke, and H.-J. Knackmuss. 1987. Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 208–210.
- Chaudhry, G.R., A.N. Ali, and W.B. Wheeler. 1988. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a *Flavobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 288–293.
- Daughton, C.G., and D.P. Hsieh. 1977. Parathion utilization by bacterial symbionts in a chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 175–184.
- Dickel, O., and H.J. Knackmuss. 1991. Catabolism of 1,3-dinitrobenzene by *Rhodococcus* sp. QT-1. *Arch. Microbiol.* 157: 76–79.
- Ebert, S., P.G. Rieger, and H.J. Knackmuss. 1999. Function of coenzyme F420 in aerobic catabolism of 2,4,6-trinitrophenol and 2,4-dinitrophenol by *Nocardioideis simplex* FJ2-1A. *J. Bacteriol.* 181: 2669–2674.
- Ecker, S., T. Widmann, H. Lenke, O. Dickel, P. Fischer, C. Bruhn, and H.-J. Knackmuss. 1992. Catabolism of 2,6-dinitrophenol by *Alcaligenes eutrophus* JMP134 and JMP222. *Arch. Microbiol.* 158: 149–154.
- Enequist, H.G., T.R. Hirst, S. Harayama, S.J. Hardy, and L.L. Randall. 1981. Energy is required for maturation of exported proteins in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 116: 227–233.
- Esteve-Nunez, A., G. Lucchesi, B. Philipp, B. Schink, and J.L. Ramos. 2000. Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11. *J. Bacteriol.* 182: 1352–1355.
- Friemann, R., M.M. Ivkovic-Jensen, D.J. Lessner, C.L. Yu, D.T. Gibson, R.E. Parales, H. Eklund, and S. Ramaswamy. 2005. Structural insight into the dioxygenation of nitroarene compounds: the crystal structure of nitrobenzene dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 348: 1139–1151.
- Gorontzy, T., J. Kuver, and K.H. Blotvogel. 1993. Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 139 Pt 6: 1331–1336.
- Groenewegen, P.E., P. Breeuwer, J.M. van Helvoort, A.A. Langenhoff, F.P. de Vries, and J.A. de Bont. 1992. Novel degradative pathway of 4-nitrobenzoate in *Comamonas acidovorans* NBA-10. *J. Gen. Microbiol.* 138 Pt 8, 1599–1605.
- Haigler, B.E., and J.C. Spain. 1993. Biodegradation of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain 4NT. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2239–2243.
- Haigler, B.E., W.H. Wallace, and J.C. Spain. 1994. Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JS42. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3466–3469.
- Hanne, L.F., L.L. Kirk, S.M. Appel, A.D. Narayan, and K.K. Bains. 1993. Degradation and induction specificity in actinomycetes that degrade *p*-nitrophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3505–3508.
- Hess, T.F., S.K. Schmidt, J. Silverstein, and B. Howe. 1990. Supplemental substrate enhancement of 2,4-dinitrophenol mineralization by a bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1551–1558.

- 20) Jain, R.K., J.H. Dreisbach, and J.C. Spain. 1994. Biodegradation of *p*-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3030–3032.
- 21) Kadiyala, V., and J.C. Spain. 1998. A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of *p*-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2479–2484.
- 22) 環境化学物質要覧. 1998. 環境庁環境化学物質研究会.
- 23) Katsivela, E., V. Wray, D.H. Pieper, and R.M. Wittich. 1999. Initial reactions in the biodegradation of 1-chloro-4-nitrobenzene by a newly isolated bacterium, strain LW1. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1405–1412.
- 24) Kimura, N., W. Kitagawa, T. Mori, N. Nakashima, T. Tamura, and Y. Kamagata. 2006. Genetic and biochemical characterization of the dioxygenase involved in lateral dioxygenation of dibenzofuran from *Rhodococcus opacus* strain SAO101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 474–484.
- 25) Kimura, N., Y. Shinozaki, T.H. Lee, and Y. Yonezawa. 2003. The microbial community in a 2,4-dinitrophenol-digesting reactor as revealed by 16S rDNA gene analysis. J. Biosci. Bioeng. 96: 70–75.
- 26) Kimura, N., Y. Shinozaki, Y. Suwa, and Y. Urushigawa. 2000. Phylogenetic and phenotypic relationships of microorganisms that degrade uncoupler compound, 2,4-dinitrophenol. J. Gen. Appl. Microbiol. 46: 317–322.
- 27) Kimura, N., and Y. Urushigawa. 2001. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin and chlorinated dibenzo-*p*-dioxin by a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101. J. Biosci. Bioeng. 92: 138–143.
- 28) Kitagawa, W., N. Kimura, and Y. Kamagata. 2004. A novel *p*-nitrophenol degradation gene cluster from a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101. J. Bacteriol. 186: 4894–4902.
- 29) Lenke, H., and H.J. Knackmuss. 1992. Initial hydrogenation during catabolism of picric acid by *Rhodococcus erythropolis* HL 24-2. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2933–2937.
- 30) Lenke, H., and H. Knackmuss. 1996. Initial hydrogenation and extensive reduction of substituted 2,4-dinitrophenols. Appl. Environ. Microbiol. 62: 784–790.
- 31) Lenke, H., D.H. Pieper, C. Bruhn, and H.-J. Knackmuss. 1992. Degradation of 2,4-dinitrophenol by two *Rhodococcus erythropolis* strains, HL 24-1 and HL 24-2. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2928–2932.
- 32) Madhavi, D.R., A. Umamaheswari, and K. Venkateswarlu. 1995. Effective concentrations of nitrophenolics toward growth yield of selected microalgae and cyanobacteria isolated from soil. Ecotoxicol. Environ. Saf. 32: 205–208.
- 33) Meulenberg, R., M. Pepi, and J.A. de Bont. 1996. Degradation of 3-nitrophenol by *Pseudomonas putida* B2 occurs via 1,2,4-benzenetriol. Biodegradation 7: 303–311.
- 34) Michan, C., A. Delgado, A. Haidour, G. Lucchesi, and J.L. Ramos. 1997. In vivo construction of a hybrid pathway for metabolism of 4-nitrotoluene in *Pseudomonas fluorescens*. J. Bacteriol. 179: 3036–3038.
- 35) Munnecke, D.M., and D.P. Hsieh. 1976. Pathways of microbial metabolism of parathion. Appl. Environ. Microbiol. 31: 63–69.
- 36) Nadeau, L.J., and J.C. Spain. 1995. Bacterial degradation of *m*-nitrobenzoic acid. Appl. Environ. Microbiol. 61: 840–843.
- 37) Nishino, S.F., and J.C. Spain. 1993. Cell density-dependent adaptation of *Pseudomonas putida* to biodegradation of *p*-nitrophenol. Environ. Sci. Technol. 27: 489–494.
- 38) Nishino, S.F., and J.C. Spain. 1993. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2520–2525.
- 39) Nishino, S.F., and J.C. Spain. 1995. Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. strain JS765. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2308–2313.
- 40) Prakash, D., A. Chauhan, and R.K. Jain. 1996. Plasmid-encoded degradation of *p*-nitrophenol by *Pseudomonas cepacia*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 224: 375–381.
- 41) Rajan, J., K. Valli, R.E. Perkins, F.S. Sariaslani, S.M. Barns, A.L. Reysenbach, S. Rehm, M. Ehringer, and N.R. Pace. 1996. Mineralization of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid): characterization and phylogenetic identification of microbial strains. J. Ind. Microbiol. 16: 319–324.
- 42) Rani, N.L., and D. Lalithakumari. 1994. Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*. Can. J. Microbiol. 40: 1000–1006.
- 43) Rhys-Williams, W., S.C. Taylor, and P.A. Williams. 1993. A novel pathway for the catabolism of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas*. J. Gen. Microbiol. 139: 1967–1972.
- 44) Rieger, P.G., V. Sinnwell, A. Preuss, W. Francke, and H.-J. Knackmuss. 1999. Hydride-Meisenheimer complex formation and protonation as key reactions of 2,4,6-trinitrophenol biodegradation by *Rhodococcus erythropolis*. J. Bacteriol. 181: 1189–1195.
- 45) Schafer, A., H. Harms, and A.J. Zehnder. 1996. Biodegradation of 4-nitroanisole by two *Rhodococcus* spp. Biodegradation 7: 249–255.
- 46) Schenzle, A., H. Lenke, P. Fischer, P.A. Williams, and H.-J. Knackmuss. 1997. Catabolism of 3-nitrophenol by *Ralstonia eutropha* JMP 134. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1421–1427.
- 47) Schenzle, A., H. Lenke, J.C. Spain, and H.-J. Knackmuss. 1999. Chemoselective nitro group reduction and reductive dechlorination initiate degradation of 2-chloro-5-nitrophenol by *Ralstonia eutropha* JMP134. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2317–2323.
- 48) Shinozaki, Y., N. Kimura, and T. Nakahara. 2002. Difference in degrading *p*-nitrophenol between indigenous bacteria in a reactor. J. Biosci. Bioeng. 93: 512–514.
- 49) Simpson, J.R., and W.C. Evans. 1953. The metabolism of nitrophenols by certain bacteria. Biochem. J. 55: xxiv.
- 50) Spain, J.C., and D.T. Gibson. 1991. Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in a *Moraxella* sp. Appl. Environ. Microbiol. 57: 812–819.
- 51) Spain, J.C., O. Wyss, and D.T. Gibson. 1979. Enzymatic oxidation of *p*-nitrophenol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 88: 634–641.
- 52) Spiess, T., F. Desiere, P. Fischer, J.C. Spain, H.-J. Knackmuss, and H. Lenke. 1998. A new 4-nitrotoluene degradation pathway in a *Mycobacterium* strain. Appl. Environ. Microbiol. 64: 446–452.
- 53) Sudhakar, B., R. Siddaramappa, P.A. Wahid, and N. Sethunathan. 1978. Conversion of *p*-nitrophenol to 4-nitrocatechol by a *Pseudomonas* sp. Antonie van Leeuwenhoek 44: 171–176.
- 54) Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fischer, J.C. Spain, and H.J. Knackmuss. 1998. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol. 64: 246–252.
- 55) Walters, D.M., R. Russ, H.J. Knackmuss, and P.E. Rouviere. 2001. High-density sampling of a bacterial operon using mRNA differential display. Gene 273: 305–315.
- 56) Won, W.D., L.H. DiSalvo, and J. Ng. 1976. Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 31: 576–580.
- 57) Zeyer, J., and P.C. Kearney. 1984. Degradation of *o*-nitrophenol and *m*-nitrophenol by a *Pseudomonas putida*. J. Agric. Food. Chem. 32: 238–242.