

海洋環境における脱ハロゲン呼吸細菌

Organohalide Respiring Bacteria in Marine Environment

二神 泰基^{1,2*}, 諸野 祐樹², 稲垣 史生²
TAIKI FUTAGAMI^{1,2*}, YUKI MORONO² and FUMIO INAGAKI²

¹九州大学 大学院農学研究院 生命機能科学部門 〒814-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

²独立行政法人海洋研究開発機構 高知コア研究所 地下生命圏研究グループ 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200

* TEL: 092-642-3955 FAX: 092-642-3959

* E-mail: futagami@brs.kyushu-u.ac.jp

¹ Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan

² Geomicrobiology Group, Kochi Institute for Core Sample Research, Japan Agency for Marine Earth Science and Technology (JAMSTEC), Monobe B200, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

キーワード: 有機ハロゲン化合物, 還元的デハロゲナーゼ, 脱ハロゲン呼吸

Key words: Organohalide, Reductive dehalogenase, Organohalide respiration

(原稿受付 2013年11月15日/原稿受理 2013年11月22日)

1. はじめに

脱ハロゲン呼吸とは、有機ハロゲン化合物を最終電子受容体としてエネルギーを獲得する嫌気呼吸である。脱ハロゲン呼吸によって生育する能力は、今日までに *Chloroflexi*, *Firmicutes*, および *Proteobacteria* 門の細菌に見出されてきた。本呼吸鎖の末端レダクターゼである還元的デハロゲナーゼ (reductive dehalogenase, RdhA) は、その最終電子伝達反応により、有機ハロゲン化合物を還元的に脱ハロゲン化する。例えば、テトラクロロエテン (PCE) を、トリクロロエテン (TCE), ジクロロエテン (おもに *cis*-ジクロロエテン, *cis*-DCE), 塩化ビニル (VC), エテンへと塩素原子を水素原子に順次置換して、無毒化することができる (図1)。RdhA による反応は、オキシゲナーゼによる酸化分解と比較して、より高度に塩素化された基質の脱ハロゲン化を得意とする傾向がある^{7,18)}。よって、脱ハロゲン呼吸は、PCE のようなポリ塩素化合物による環境汚染の修復において重要な反応であり、実際に、塩素化エテン類による土壌や地下水の汚染の修復に利用されている^{40,56)}。これらの脱ハロゲン呼吸細菌は、もともとは自然環境中に存在する有機ハロゲン化合物を用いる微生物から進化してきたものと推測されている。近年、環境中での脱ハロゲン呼吸細菌の生態や、その進化過程に関する知見も少しずつ集積しつつある。本稿では、まず、重要な機能遺伝子である RdhA の諸性質について解説した後に、自然環境のなかでも海洋環境における脱ハロゲン呼吸に焦点を当てたい。

2. 還元的デハロゲナーゼの諸性質と進化

脱ハロゲン呼吸細菌が基質とするハロゲン化合物は株レベルで異なっており、これは保持している RdhA の違いによると考えられる。図2に、これまでに基質が明らかにされている主要な RdhA についてまとめた。例えば、*Desulfitobacterium hafniense* Y51 株は PCE デハロゲナーゼ (PceA) により PCE と TCE を *cis*-DCE へと脱塩素化する^{61,62)}。同様の PceA を有する *Desulfitobacterium hafniense* TCE1 株と *Dehalobacter restrictus* PER-K23 株も同様の脱塩素化反応を行う⁴⁴⁾。一方、*Desulfitobacterium hafniense* DCB-2 株は PceA を保持しておらず PCE を効率よく脱塩素化できないが、クロロフェノールデハロゲナーゼ (CprA) によりクロロフェノール類を脱塩素化することができる^{13,34)}。バイオレメディエーションにおいて、これらの RdhA は、脱ハロゲン呼吸のバイオマーカーとして重要なため、リアルタイム PCR 法などによる定量的検出法が開発されている¹⁴⁾。

いくつかの例外を除いて、これまでに生化学的性質が解析された還元的デハロゲナーゼは以下の特徴を有している^{29,59)}。まず、N 末端に Tat (twin arginine translocation) システムにより認識されるシグナル配列が存在する。Tat システムは細胞内外膜間への蛋白質輸送系であり、例えば、*D. hafniense* Y51 株の PceA はペリプラズムに局在することが確認されている⁶²⁾。次に、補因子として1つのコリノイドと2つの鉄-硫黄クラスターを有している。コリノイドはコリン環を主要骨格とする化合物であり、代表的なものにコバルト (Co) 錯体であるビタミン B₁₂ が挙げられる。還元型のコリノイドは単独でも脱塩素化活性を有することやコリノイド阻害剤であ

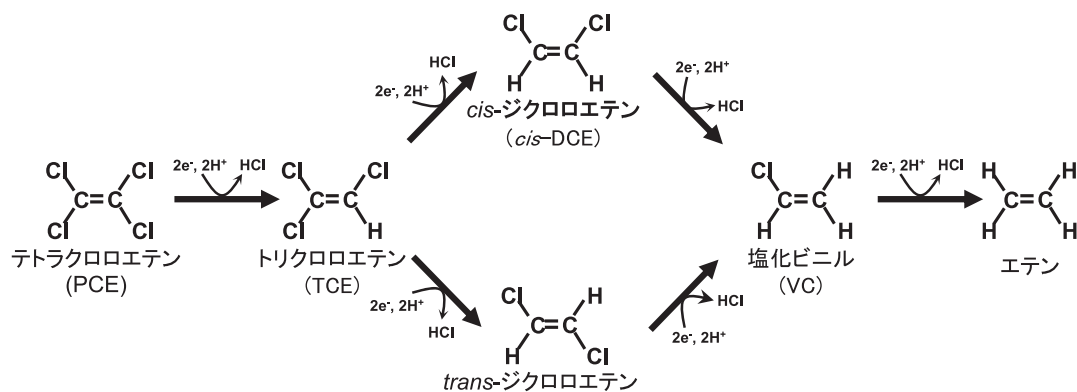


図1. クロロエテン類の還元的脱ハロゲン反応.

タンパク質名	宿主	反応	アクセッション番号	文献
PceA	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	PCE → TCE → <i>cis</i> -DCE	AAW80323	62
PceA	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> TCE1	PCE → TCE → <i>cis</i> -DCE	CAD28792	44
PceA	<i>Dehalobacter restrictus</i> PER-K23	PCE → TCE → <i>cis</i> -DCE	CAD28790	44
PceA	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> PCE-S	PCE → TCE → <i>cis</i> -DCE	AAO60101	44,48
DcaA	<i>Desulfitobacterium dichloroeliminans</i> DCA1	1,2-DCA → ETH	CAJ75430	45
CprA5	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> PCP-1	3,5-dichlorophenol → 3-CP	AAQ54585	64
Ssed_3769	<i>Shewanella sediminis</i>	PCE → TCE	ABV38373	42
PceA	<i>Sulfurospirillum multivorans</i>	PCE → TCE → <i>cis</i> -DCE	AAC60788	55
CprA	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> JWIU-DC1	3Cl4OHPA → 4-OHPA	AAD44542	68
PrdA	<i>Desulfitobacterium</i> sp. KBC1	PCE → TCE	BAE45338	66
CbrA	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> CBDB1	1,2,3,4-TeCB → 1,2,4-TCB	CAI82345	2
VcrA	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> VS	<i>cis</i> -DCE → VC → ETH	AAQ94119	52
BvcA	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> BAV1	<i>cis</i> -DCE → VC → ETH	AAT64888	37
TceA	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195	TCE → <i>cis</i> -DCE → VC → ETH	AAW39060	43

図2. 還元的デハロゲナーゼの系統樹.

系統樹はNJ法によって作成された。それぞれの反応は、あくまで代表的な反応であり、例えば、*S. multivorans* と *D. hafniense* PCE-S 株の PceA は臭素化エテン類も脱臭素化する⁷⁹。PCE: tetrachloroethene, TCE: trichloroethene, DCE: dichloroethene, VC: vinyl chloride, ETH: ethene, DCA: dichloroethane, CP: chlorophenol, 3Cl4OHPA: 3-chloro-4-hydroxyphenylacetate, 4-OHPA: 4-hydroxyphenylacetate, TeCB: tetrachlorobenzene, TCB: trirachlorobenzene.

るヨウ化プロピルにより還元的デハロゲナーゼの活性が阻害されることから、コリノイドが脱ハロゲン化反応の活性中心とされる^{6,48,53,62}。コリノイドは、*S. multivorans* から唯一結晶構造が解析され、Norpsudovitamin B₁₂ であることが示されている³⁸。また、*S. multivorans* の PceA の脱ハロゲン活性は、コリノイド単独での反応と比べておよそ 4800 倍と見積もられている^{38,47,54}。還元的デハロゲナーゼの反応機構として、コリノイドと鉄-硫黄クラスターが関与するモデルが提示されている。反応機構については、図書と総説を参照していただきたい^{19,28}。

これまでに明らかになっている還元的デハロゲナーゼの相同性と基質特異性における関係を図3に例示した。まず、関係①として、*Dehalobacter restrictus* PER-K23 株、*D. hafniense* Y51, TCE1, および PCE-S 株の PceA と、*S. multivorans* の PceA は、同様に PCE と TCE を *cis*-DCE へと脱塩素化するが、互いの相同性は 27% と低い。その一方で、関係②として、*Desulfitobacterium*

dichloroeliminans DCA1 株の DcaA は、*Dehalobacter restrictus* PER-K23 株、*D. hafniense* Y51, TCE1, および PCE-S 株の PceA とおよそ 90% の比較的高い相同性を示すが、基質特異性が異なる。PceA は、水素化分解 (hydrogenolysis) により PCE を *cis*-DCE へと脱塩素化するが、DcaA は、二塩素除去反応 (dichloroelimination) により、1,2-ジクロロエタンの 2 つの塩素原子を同時に除去し、エテンに変換する。DcaA は、1,2-ジクロロエタンに 30 年以上汚染されていた地下水に由来する集積培養物のメタゲノムからも見つかっており、1,2-ジクロロエタンへの曝露が DcaA の進化過程に関与した可能性が指摘されている^{16,45}。PceA に対する DcaA の進化速度を Nei と Gojobori の方法を用いて評価した結果、DcaA の進化過程において、生存に有利な変異が蓄積する自然選択が働いたことが示されている。さらに、関係③として、99% 以上の高い相同性をもつ PceA が属の異なる宿主に存在することが挙げられる。これは、*pceA* 遺伝子の水平伝播の可能性を示しており、実際に、*D.*

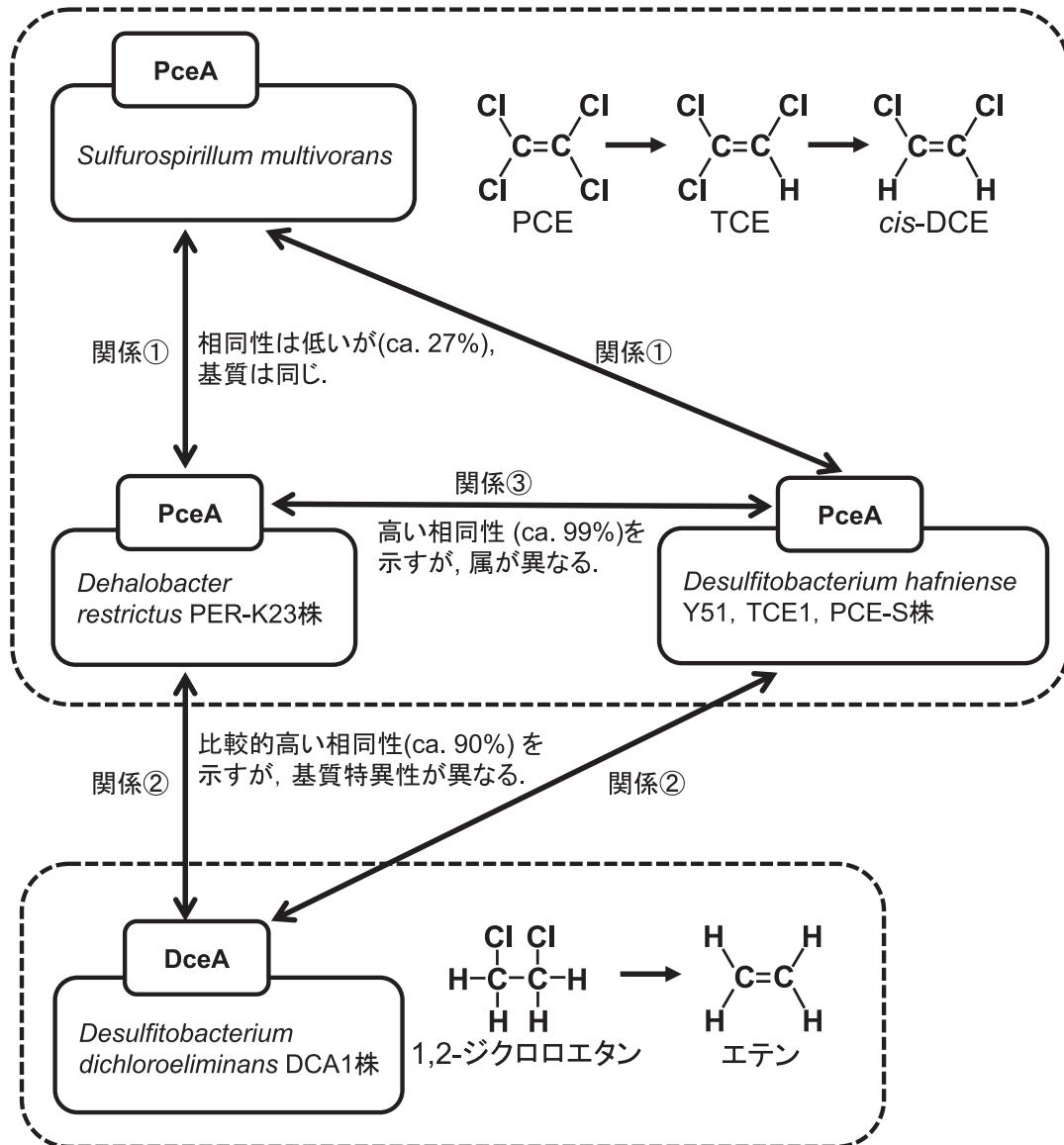


図3. 還元的デハロゲナーゼに見られる関係の概略.

hafniense Y51株のPCEデハロゲナーゼ遺伝子クラスター (*pceABCT*) は *ISDesp1* と *ISDesp2* の2つの相同なIS因子に挟まれており、複合トランスポゾンを形成している^{22,23}。微生物の迅速な環境適応や機能進化の過程には転移因子による遺伝子の重複や水平伝播が重要な役割を担っている場合が多いが^{65,69}、*RdhA* についてもこれらの現象が関与していると考えられる。以上を踏まえて、次項から海洋環境中の脱ハロゲン呼吸に関する知見を記述したい。

3. 海洋環境中の有機ハロゲン化合物

産業界においては、有用な化学物質として、クロロエタン類、クロロエテン類、クロロメタン類、クロロベンゼン類、ポリ塩化ビフェニル類などの様々な有機塩素化合物が大量に製造されてきた¹²。一方、自然環境下においても生物地球化学的反応に起因する有機ハロゲン化合物が生産される。今日までにおよそ4000種類の自然環

境に由来する有機ハロゲン化合物（そのほとんどは、臭素あるいは塩素化合物）が同定されている^{24,25}。細菌、糸状菌、植物、海綿、蠕虫、昆虫、動物などによる生物生産や、森林火災や火山活動による生産が知られている。

生物起源の有機ハロゲン化合物は、とくに海洋性の軟体動物、藻類、多毛類、クラゲ、海綿などから多く同定されている^{24,25}。例えば、PCEとTCEも、海洋性藻類から検出されている⁵⁰。また、海綿は、有機ハロゲン化合物を二次代謝物として大量に生産し、とくに臭素化合物はその乾燥菌体重量の10%以上におよぶ^{63,67}。具体的には、臭素化合物としてプロモインドール、プロモフェノール、ポリ臭素化ジフェニルエーテル、臭素化ジベンゾ-*p*-ダイオキシンなどを生産することが知られており、これらは魚類などの捕食者に対する化学防除や生物付着を防ぐために生産すると考えられている^{9,17,27,57,77}。これらの自然環境に由来する有機ハロゲン化合物は、人工のものと同様に、海洋環境の頂点捕食者に高濃度に蓄

積することも知られている⁷⁰⁻⁷²⁾。また、これらの自然由来の有機ハロゲン化合物は、人工の有機ハロゲン化合物が環境中に放出する以前から存在していたことから、脱ハロゲン呼吸細菌の起源を考察する上で重要であると考えられる。

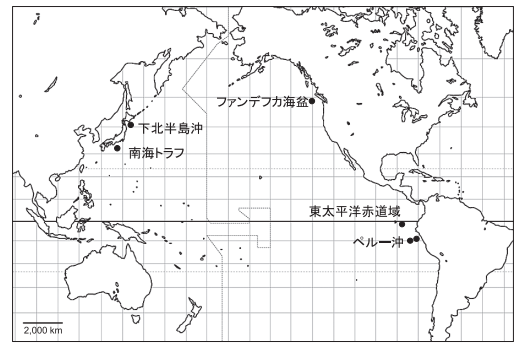
4. 海洋環境における還元的脱ハロゲン活性

1988年に、海岸堆積物において2,4-ジブロモフェノールが微生物によって脱臭素化されることがKingによってはじめて報告された³⁵⁾。その後、今日までに海洋環境(汽水域を含む)から*Desulfovibrio*, *Desulfomonile*, *Dehalobium*, *Dehalococcoides*属などの脱ハロゲン呼吸細菌が分離されている。まず、ニューヨーク州ニュージャージー港のアーサー・キル(海峡)から分離された*Desulfovibrio* sp. TBP-1株は、2,4,6-トリブロモフェノールを電子受容体として生育する⁸⁾。また、フロリダの海洋堆積物から分離された*Desulfomonile limimaris* DCB-M株、およびDCB-F株は、3-クロロ安息香酸を安息香酸へと脱塩素化する⁶⁰⁾。一方、*Dehalobium*属と*Dehalococcoides*属は、*Chloroflexi*門の*Dehalococcoidetes*目(Subphylum II)に分類される^{30,41,58)}。これまでに*Chloroflexi*門から分離されたすべての脱ハロゲン呼吸細菌は、脱ハロゲン呼吸のみをエネルギー生産系としてもつことが知られている。米国サウスカロライナ州のチャールストン港から分離された*Dehalobium chloroocercia* DF-1株は、ポリ塩化ビフェニル類を脱塩素化する^{46,78)}。また、サンフランシスコ湾から分離された*Dehalococcoides mccartyi* MB株は、PCEをtrans-1,2-DCEへと脱塩素化する¹¹⁾。一方、最近、海洋堆積物中の*Dehalococcoidia*綱のシングルセルゲノム解析が行われた結果、*rdhA*が見出されなかったことから、脱ハロゲン呼吸とは異なるエネルギー獲得系をもつ*Dehalococcoidia*綱も存在する可能性が指摘されている⁷⁴⁾。

また、分離されていないが、分子生態学的手法により汽水域や干潟堆積物に還元的脱ハロゲン反応を行う*Chloroflexi*門が検出されている^{15,36,76,80)}。深海の海洋堆積物にも*Chloroflexi*門が優先種のひとつとして検出されており、その一部はSubphylum IIに分類されるため、脱ハロゲン呼吸が起きている可能性が示唆された^{1,31,32)}。さらに、機能遺伝子である*rdhA*のホモログがペルー沖、東太平洋赤道域、ファンデフカ海盆、下北半島沖、南海トラフの、調査されたすべての地点から検出された(図4)^{20,21)}。もっとも深い試料は、358 mbsf、およそ46万年前の堆積物である⁹⁾。この事は46万年前に脱ハロゲン呼吸細菌が存在していた可能性も示し、脱ハロゲン微生物の進化に興味を持たれる。なお、南海トラフの比較的浅い試料(4.7 mbsf)から2,4,6-トリブロモフェノールの脱臭素活性が検出されているが、海洋堆積物の深部試料には脱ハロゲン活性は検出されていない^{20,21)}。海底下深部の微生物の世代時間は数百年から数千年と言われており、代謝活動が非常に低いことにより活性が検出されなかった可能性がある^{33,51)}。

海洋環境におけるハロゲン循環に脱ハロゲン呼吸細菌が関与する例として、臭素化フェノールを生産する海洋性海綿*Aplysina aerophoba*と共生する脱臭素微生物が

A



B

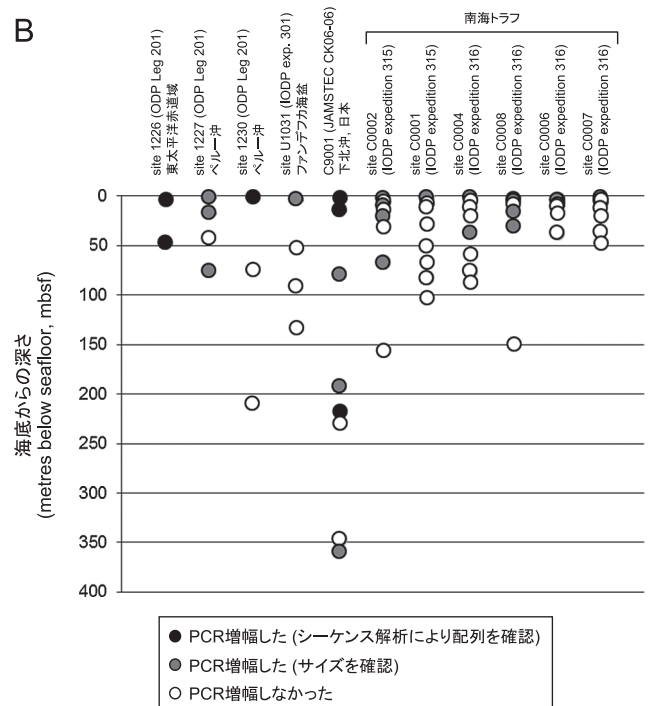


図4. 海洋堆積物中の*rdhA*ホモログ遺伝子の検出。

(A) サンプリング地点。(B) PCRによる*rdhA*ホモログ遺伝子の検出結果。

よく研究されている^{4,26)}。本微生物群集からは、*rdhA*ホモログ遺伝子も検出されている。さらに、本海綿から脱臭素細菌*Desulfoluna spongiiphila* AA1株が分離された³⁾。また、有機ハロゲン化合物を生産するギボシムシから、2,4,6-トリブロモフェノールを脱臭素化する*Propionigenium maris* DSL-1株とML-1株が見つかった⁷⁵⁾。以上のように、海洋環境における脱ハロゲン化反応には、臭素化合物に関する報告がおおく見られる。実際に、環境修復の観点から陸域において分離された脱ハロゲン呼吸細菌においても、有機塩素化合物だけでなく有機臭素化合物も分解することが見出されている。例えば、*Dehalococcoides mccartyi* CBDB1株の場合では、塩素化ベンゼン類よりも臭素化ベンゼン類に対するより広い脱ハロゲン活性をもつことが示された^{2,73)}。また、*S. multivorans*と*D. hafniense* PCE-S株のPceAも、クロロエテン類の*RdhA*として同定されたが、その後、臭素化エテン類も脱臭素化することが明らかになっている⁷⁹⁾。

5. おわりに

本稿では海洋環境における脱ハロゲン呼吸細菌に関する知見を紹介したが、陸域においても同様に、脱ハロゲン呼吸細菌が自然由来の有機ハロゲン化合物の分解に関わることが明らかになりつつある。例として、担子菌が産生する塩素化ハイドロキノン代謝物を *Desulfotobacterium* 属細菌が脱塩素化することが報告されている⁴⁹⁾。また、自然環境中の有機ハロゲン化合物と *Dehalococcoides*-like *Chloroflexi* の量に正の相関関係があることが示されている³⁹⁾。

最近、好気性細菌 *Comamonas* sp. 7D-2 から RdhA ドメインと NAD(P)H-dependent oxidoreductase ドメインからなる新規なデハロゲナーゼが同定され、新しいタイプの RdhA が海洋性 *Proteobacteria* 門に広く存在することが示唆された¹⁰⁾。このことから、RdhA による脱ハロゲン反応は、海洋環境中のハロゲン循環に、より多様な場面で関わっている可能性がある。さらに、海底堆積物のメタゲノム解析によって多様な *rdhA* ホモログの存在が定量的に明らかになりつつある。今後、脱ハロゲン呼吸細菌のハロゲン循環への寄与の程度や、多様な *rdhA* ホモログの機能などが解明されることが期待される。

謝 辞

本研究は、九州大学古川謙介名誉教授のもとで行った脱ハロゲン呼吸に関する研究が基礎になっております。ここに、心より感謝申し上げます。

文 献

- Adrian, L. 2009. ERC-group microflex: microbiology of *Dehalococcoides*-like *Chloroflexi*. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 8: 225–229.
- Adrian, L., J. Rahnenfuhrer, J. Gobom, and T. Holscher. 2007. Identification of a chlorobenzene reductive dehalogenase in *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. Appl. Environ. Microbiol. 73: 7717–7724.
- Ahn, Y.B., L.J. Kerkhof, and M.M. Häggblom. 2009. *Desulfoluna spongiiphila* sp. nov., a dehalogenating bacterium in the marine sponge *Aplysina aerophoba*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2133–2139.
- Ahn, Y.B., S.K. Rhee, D.E. Fennell, L.J. Kerkhof, U. Hentschel, and M.M. Häggblom. 2003. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4159–4166.
- Aoike, K. 2007. CDEX Laboratory Operation Report: CK06-06 D/V Chikyu shakedown cruise offshore Shimokita. Yokohama (CDEX-JAMSTEC).
- Banerjee, R. and S.W. Ragsdale. 2003. The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. Annu. Rev. Biochem. 72: 209–247.
- Bossert, I.D., M.M. Häggblom, and L.Y. Young. 2003. Microbial ecology of dehalogenation, pp. 33–52. In M.M. Häggblom, and I.D. Bossert (eds.), Dehalogenation: Microbial processes and environmental applications. Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London.
- Boyle, A.W., C.D. Phelps, and L.Y. Young. 1999. Isolation from estuarine sediments of a *Desulfovibrio* strain which can grow on lactate coupled to the reductive dehalogenation of 2,4,6-tribromophenol. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1133–1140.
- Chanas, B. and J.R. Pawlik. 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. II. Spicules, tissue toughness, and nutritional quality. Mar. Ecol. Prog. Ser. 127: 195–211.
- Chen, K., L. Huang, C. Xu, X. Liu, J. He, S.H. Zinder, S. Li, and J. Jiang. 2013. Molecular characterization of the enzymes involved in the degradation of a brominated aromatic herbicide, Mol. Microbiol. 89: 1121–1139.
- Cheng, D. and J. He. 2009. Isolation and characterization of “*Dehalococcoides*” sp. strain MB, which dechlorinates tetrachloroethene to *trans*-1,2-dichloroethene, Appl. Environ. Microbiol. 75: 5910–5918.
- Christen, K. 1999. U.N. Negotiations on POPs snag on malaria. Environ. Sci. Technol. 33: 444A–5A.
- Christiansen, N., B.K. Ahring, G. Wohlfarth, and G. Diekert. 1998. Purification and characterization of the 3-chloro-4-hydroxy-phenylacetate reductive dehalogenase of *Desulfotobacterium hafniense*. FEBS Lett. 436: 159–162.
- Cupples, A.M. 2008. Real-time PCR quantification of *Dehalococcoides* populations: methods and applications. J. Microbiol. Methods. 72: 1–11.
- Cutter, L.A., J.E. Watts, K.R. Sowers, and H.D. May. 2001. Identification of a microorganism that links its growth to the reductive dechlorination of 2,3,5,6-chlorobiphenyl. Environ. Microbiol. 3: 699–709.
- De Wildeman, S., G. Diekert, H. Van Langenhove, and W. Verstraete. 2003. Stereoselective microbial dehalorespiration with vicinal dichlorinated alkanes. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5643–5647.
- Ebel, R., M. Brenzinger, A. Kunze, H.J. Gross, and P. Proksch. 1997. Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. J. Chem. Ecol. 23: 1451–1461.
- Furukawa, K. 2006. Oxygenases and dehalogenases: molecular approaches to efficient degradation of chlorinated environmental pollutants. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70: 2335–2348.
- Futagami, T., M. Goto, and K. Furukawa. 2008. Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. Chem. Rec. 8: 1–12.
- Futagami, T., Y. Morono, T. Terada, A.H. Kaksonen, and F. Inagaki. 2013. Distribution of dehalogenation activity in sub-seafloor sediments of the Nankai Trough subduction zone. Phil. Trans. R. Soc. B. 368: 20120249.
- Futagami, T., Y. Morono, T. Terada, A.H. Kaksonen, and F. Inagaki. 2009. Dehalogenation activities and distribution of reductive dehalogenase homologous genes in marine subsurface sediments. Appl. Environ. Microbiol. 75: 6905–6909.
- Futagami, T., Y. Tsuboi, A. Suyama, M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Emergence of two types of nondechlorinating variants in the tetrachloroethene-halorespiring *Desulfotobacterium* sp. strain Y51. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70: 720–728.
- Futagami, T., T. Yamaguchi, S. Nakayama, M. Goto, K. Furukawa. 2006. Effects of chloromethanes on growth of and deletion of the *pce* gene cluster in dehalorespiring *Desulfotobacterium hafniense* strain Y51. Appl. Environ. Microbiol. 72: 5998–6003.
- Gribble, G.W. 2003. The diversity of naturally produced organohalogenes. Chemosphere. 52: 289–297.
- Gribble, G.W. 2010. Naturally occurring organohalogen compounds—a comprehensive update. 1st edn. Springer-Verlag, Vienna, Austria.
- Häggblom, M.M., Y.B. Ahn, D.E. Fennell, L.J. Kerkhof, and S.K. Rhee. 2003. Anaerobic dehalogenation of organohalide contaminants in the marine environment, Adv. Appl. Microbiol. 53: 61–84.
- Hedner, E., M. Sjogren, S. Hodzic, R. Andersson, U. Goransson, P.R. Jonsson, and L. Bohlin. 2008. Antifouling activity of a dibrominated cyclopeptide from the marine sponge *Geodia barretti*. J. Nat. Prod. 71: 330–333.

- 28) Holliger, C., C. Regeard, and G. Diekert. 2003. Dehalogenation by anaerobic bacteria, pp. 115–158. In M.M. Häggblom and I.D. Bossert (eds.), *Dehalogenation: Microbial processes and environmental applications*. Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London.
- 29) Hug, L.A., F. Maphosa, D. Leys, F.E. Löffler, H. Smidt, E.A. Edwards, and L. Adrian. 2013. Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 368: 20120322.
- 30) Hugenholtz, P. and E. Stackebrandt. 2004. Reclassification of *Sphaerobacter thermophilus* from the subclass *Sphaerobacteridae* in the phylum *Actinobacteria* to the class *Thermomicrobia* (emended description) in the phylum *Chloroflexi* (emended description). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2049–2051.
- 31) Inagaki, F., T. Nunoura, S. Nakagawa, A. Teske, M. Lever, A. Lauer, M. Suzuki, K. Takai, M. Delwiche, F.S. Colwell, K.H. Nealson, K. Horikoshi, S. D'Hondt, and B.B. Jørgensen. 2006. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 2815–2820.
- 32) Inagaki, F., M. Suzuki, K. Takai, H. Oida, T. Sakamoto, K. Aoki, K.H. Nealson, and K. Horikoshi. 2003. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the sea of okhotsk. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7224–7235.
- 33) Jørgensen, B.B. 2011. Deep seafloor microbial cells on physiological standby. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 18193–18194.
- 34) Kim, S.H., C. Harzman, J.K. Davis, R. Hutcheson, J.B. Broderick, T.L. Marsh, and J.M. Tiedje. 2012. Genome sequence of *Desulfotobacterium hafniense* DCB-2, a Gram-positive anaerobe capable of dehalogenation and metal reduction. *BMC Microbiol.* 12: 21-2180-12-21.
- 35) King, G.M. 1988. Dehalogenation in marine sediments containing natural sources of halophenols. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 3079–3085.
- 36) Kittelmann, S. and M.W. Friedrich. 2008. Novel uncultured *Chloroflexi* dechlorinate perchloroethene to *trans*-dichloroethene in tidal flat sediments. *Environ. Microbiol.* 10: 1557–1570.
- 37) Krajmalnik-Brown, R., T. Holscher, I.N. Thomson, F.M. Saunders, K.M. Ritalahti, F.E. Löffler. 2004. Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6347–6351.
- 38) Kräutler, B., W. Fieber, S. Ostermann, K.H. Ongania, K. Gruber, C. Kratky, C. Mikl, A. Siebert, and G. Diekert. 2003. The cofactor of tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans* is norpseudob12, a new type of a natural corrinoid. *Helv. Chim. Acta.* 86: 3698–3716.
- 39) Krzmarzick, M.J., B.B. Cray, J.J. Harding, O.O. Oyerinde, A.C. Leri, S.C. Myneni, and P.J. Novak. 2012. Natural niche for organohalide-respiring *Chloroflexi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 393–401.
- 40) Löffler, F.E. and E.A. Edwards. 2006. Harnessing microbial activities for environmental cleanup. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 274–284.
- 41) Löffler, F.E., J. Yan, K.M. Ritalahti, L. Adrian, E.A. Edwards, K.T. Konstantinidis, J.A. Muller, H. Fullerton, S.H. Zinder, and A.M. Spormann. 2013. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 625–635.
- 42) Lohner, S.T. and A.M. Spormann. 2013. Identification of a reductive tetrachloroethene dehalogenase in *Shewanella sediminis*. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 368: 20120326.
- 43) Magnuson, J.K., M.F. Romine, D.R. Burris, and M.T. Kingsley. 2000. Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of *tceA* and substrate range characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5141–5147.
- 44) Maillard, J., W. Schumacher, F. Vazquez, C. Regeard, W.R. Hagen, and C. Holliger. 2003. Characterization of the corrinoid iron-sulfur protein tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4628–4638.
- 45) Marzorati, M., F. de Ferra, H. Van Raemdonck, S. Borin, E. Alliffranchini, G. Carpani, L. Serbolisca, W. Verstraete, N. Boon, and D. Daffonchio. 2007. A novel reductive dehalogenase, identified in a contaminated groundwater enrichment culture and in *Desulfotobacterium dichloroeliminans* strain DCA1, is linked to dehalogenation of 1,2-dichloroethane. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2990–2999.
- 46) May, H.D., G.S. Miller, B.V. Kjellerup, and K.R. Sowers. 2008. Dehalorespiration with polychlorinated biphenyls by an anaerobic ultramicrobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2089–2094.
- 47) McCauley, K.M., D.A. Pratt, S.R. Wilson, J. Shey, T.J. Burkey, and W.A. van der Donk. 2005. Properties and reactivity of chlorovinylcobalamin and vinylcobalamin and their implications for vitamin B12-catalyzed reductive dechlorination of chlorinated alkenes. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 1126–1136.
- 48) Miller, E., G. Wohlfarth, and G. Diekert. 1997. Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfotobacterium* sp. strain PCE-S. *Arch. Microbiol.* 168: 513–519.
- 49) Milliken, C.E., G.P. Meier, J.E. Watts, K.R. Sowers, and H.D. May. 2004. Microbial anaerobic demethylation and dechlorination of chlorinated hydroquinone metabolites synthesized by basidiomycete fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 385–392.
- 50) Moore, R.M. 2003. Marine sources of volatile organohalogenes. *The Handbook of Environmental Chemistry*. Vol. 3. Part P: 85–101.
- 51) Morono, Y., T. Terada, M. Nishizawa, M. Ito, F. Hillion, N. Takahata, Y. Sano, and F. Inagaki. 2011. Carbon and nitrogen assimilation in deep seafloor microbial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 18295–18300.
- 52) Müller, J.A., B.M. Rosner, G. Von Abendroth, G. Meshulam-Simon, P.L. McCarty, and A.M. Spormann. 2004. Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4880–4888.
- 53) Neumann, A., H. Scholz-Muramatsu, and G. Diekert. 1994. Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.* 162: 295–301.
- 54) Neumann, A., A. Siebert, T. Trescher, S. Reinhardt, G. Wohlfarth, and G. Diekert. 2002. Tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*: substrate specificity of the native enzyme and its corrinoid cofactor. *Arch. Microbiol.* 177: 420–426.
- 55) Neumann, A., G. Wohlfarth, and G. Diekert. 1998. Tetrachloroethene dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the *pceA* gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 4140–4145.
- 56) 奥津徳也, 田村 渉, 上野俊洋, 石田浩昭. 2013. *Dehalococcoides* 属細菌を含む複合微生物系を利用したバイオオーグメンテーション技術の開発と現場適用. *環境バイオテクノロジー学会誌.* 13: 13–18.
- 57) Pawlik, J.R., B. Chanas, R.J. Toonen, W. Fenical. 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 127: 183–194.
- 58) Sekiguchi, Y., T. Yamada, S. Hanada, A. Ohashi, H. Harada, and Y. Kamagata. 2003. *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel fil-

- amentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain Bacteria at the subphylum level. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1843–1851.
- 59) Smidt, H. and W.M. de Vos. 2004. Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 43–73.
- 60) Sun, B., J.R. Cole, and J.M. Tiedje. 2001. *Desulfomonile limimaris* sp. nov., an anaerobic dehalogenating bacterium from marine sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 365–371.
- 61) Suyama, A., R. Iwakiri, K. Kai, T. Tokunaga, N. Sera, and K. Furukawa. 2001. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1474–1481.
- 62) Suyama, A., M. Yamashita, S. Yoshino, and K. Furukawa. 2002. Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. *J. Bacteriol.* 184: 3419–3425.
- 63) Teeyapant, R., H.J. Woerdenbag, P. Kreis, J. Hacker, V. Wray, L. Witte, and P. Proksch. 1993. Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Z. Naturforsch. C.* 48: 939–945.
- 64) Thibodeau, J., A. Gauthier, M. Duguay, R. Villemur, F. Lepine, P. Juteau, and R. Beaudet. 2004. Purification, cloning, and sequencing of a 3,5-dichlorophenol reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium frapperii* PCP-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4532–4537.
- 65) Tsuda, M., H.M. Tan, A. Nishi, and K. Furukawa. 1999. Mobile catabolic genes in bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 401–410.
- 66) Tsukagoshi, N., S. Ezaki, T. Uenaka, N. Suzuki, R. Kurane. 2006. Isolation and transcriptional analysis of novel tetrachloroethene reductive dehalogenase gene from *Desulfitobacterium* sp. strain KBC1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 543–553.
- 67) Turon, X., M.A. Becerro, and M.J. Uriz. 2000. Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of X-ray microanalysis with cryofixation techniques. *Cell Tissue Res.* 301: 311–322.
- 68) van de Pas, B.A., H. Smidt, W.R. Hagen, J. van der Oost, G. Schraa, A.J. Stams, and W.M. de Vos. 1999. Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halorespiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*. *J. Biol. Chem.* 274: 20287–20292.
- 69) van der Meer, J.R., W.M. de Vos, S. Harayama, and A.J. Zehnder. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56: 677–694.
- 70) Vetter, W. and G.W. Gribble. 2007. Anthropogenic persistent organic pollutants—lessons to learn from halogenated natural products. *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 2249–2252.
- 71) Vetter, W., E. Scholz, C. Gaus, J.F. Muller, and D. Haynes. 2001. Anthropogenic and natural organohalogen compounds in blubber of dolphins and dugongs (*Dugong dugon*) from northeastern Australia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 221–231.
- 72) Vetter, W., E. Stoll, M.J. Garson, S.J. Fahey, C. Gaus, and J.F. Muller. 2002. Sponge halogenated natural products found at parts-per-million levels in marine mammals. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 2014–2019.
- 73) Wagner, A., M. Cooper, S. Ferdi, J. Seifert, and L. Adrian. 2012. Growth of *Dehalococcoides mccartyi* strain CBDB1 by reductive dehalogenation of brominated benzenes to benzene. *Environ. Sci. Technol.* 46: 8960–8968.
- 74) Wasmund, K., L. Schreiber, K.G. Lloyd, D.G. Petersen, A. Schramm, R. Stepanauskas, B.B. Jørgensen, and L. Adrian. 2013. Genome sequencing of a single cell of the widely distributed marine subsurface *Dehalococcoidia*, phylum *Chloroflexi*. *ISME J.* doi: 10.1038/ismej.2013.143.
- 75) Watson, J., G.Y. Matsui, A. Leaphart, J. Wiegel, F.A. Rainey, and C.R. Lovell. 2000. Reductively debrominating strains of *Propionigenium maris* from burrows of bromophenol-producing marine infauna. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1035–1042.
- 76) Watts, J.E., S.K. Fagervold, H.D. May, and K.R. Sowers. 2005. A PCR-based specific assay reveals a population of bacteria within the *Chloroflexi* associated with the reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *Microbiology.* 151: 2039–2046.
- 77) Weiss, B., R. Ebel, M. Elbrächter, M. Kirchner, and P. Proksch. 1996. Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Biochem. Syst. Ecol.* 24: 1–12.
- 78) Wu, Q., J.E. Watts, K.R. Sowers, and H.D. May. 2002. Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 807–812.
- 79) Ye, L., A. Schilhabel, S. Bartram, W. Boland, and G. Diekert. Reductive dehalogenation of brominated ethenes by *Sulfurospirillum multivorans* and *Desulfitobacterium hafniense* PCE-S. *Environ. Microbiol.* 12: 501–509.
- 80) Zanolli, G., A. Balloi, A. Negroni, L. Borruso, D. Daffonchio, and F. Fava. 2012. A *Chloroflexi* bacterium dechlorinates polychlorinated biphenyls in marine sediments under in situ-like biogeochemical conditions. *J. Hazard. Mater.* 209–210: 449–457.