

メタゲノムアプローチの新規手法

New methods in the metagenome approach

下山 武文, 加藤創一郎, 渡辺 一哉 *

TAKEFUMI SHIMOYAMA, SOUICHIRO KATO and KAZUYA WATANABE

海洋バイオテクノロジー研究所 微生物利用領域 〒026-0001 岩手県釜石市平田 3-75-1

* TEL: 0193-26-6581 FAX: 0193-26-6592

* E-mail: kazuya.watanabe@mbio.jp

Division of Applied Microbiology, Marine Biotechnology Institute, 3-75-1 Heita, Kamaishi, Iwate 026-0001, Japan

キーワード: メタゲノム, SIGEX, IAN-PCR, 群集トランスクリプトーム解析

Key words: metagenome, SIGEX, IAN-PCR, PARM, community transcriptome

(原稿受付 2007年10月15日/原稿受理 2007年10月18日)

1. はじめに

これまでに、微生物からさまざまな生理活性物質や酵素がスクリーニングされてきた。しかし自然環境中の微生物の大部分はいまだ分離・培養されておらず、今後も単離は困難と考えられる。近年、環境試料から培養過程を経ず、直接微生物ゲノムを抽出し産業上有用な新規酵素遺伝子あるいは生理活性物質産生酵素遺伝子を単離する試み(本稿ではメタゲノム法と呼ぶ)がなされるようになってきた。環境から直接抽出された微生物ゲノムはメタゲノムや eDNA など^{4,10,12)}と呼ばれている。過去には、多くの夾雑物を含む土壌などの環境試料から純度の高いメタゲノムを抽出することは困難と考えられていたが、1980年代に Torsvic ら¹⁾が土壌を遠心分離することによる微生物ゲノムの回収に成功した。さらにその後、土壌中で微生物を溶菌させてからゲノムを回収・精製する方法がとられるようになり、以降多くの研究者がこの方法で良質なメタゲノムを抽出するようになってきている。その結果、今までにメタゲノムから微生物の遺伝子クラスター全体をクローニングした例⁹⁾や、新規抗生物質を得た例³⁾などが報告されてきている。最近では環境サンプルから微生物ゲノムを抽出するキットが販売されるなど、ますます簡便にメタゲノムが抽出できるようになり、それに準じてこの分野への期待も増すようになってきたと思われる。

我々は、微生物集団の機能解析やその中の未知有用遺伝子の探索を目指したメタゲノムアプローチにおいて、微生物の遺伝子発現制御(転写制御)を利用した手法の開発を行ってきた。メタゲノムから有用遺伝子の取得を試みる場合、メタゲノムライブラリーには非常に多様な遺伝子が含まれるが、現在の技術ではその全体を把握することはできない。または、現在用いられているスクリーニング法ではその中のほんの一部の遺伝子しか回収でき

ない。同様に、メタゲノムを微生物集団の機能解析に利用する場合には一部優占種微生物のゲノムにしかアクセスできないという問題がある。メタゲノム法の有用性を増すためには、現在の技術では検出することのできない未知の遺伝子にアクセスする新たな方法が必要になる。本稿では、未知の遺伝子にアクセスするために我々が近年開発してきた方法を紹介する。

2. メタゲノム法の問題点

メタゲノム法を行う際の1つの目的として、メタゲノムを網羅的に解読することにより微生物集団の機能解析を網羅することが挙げられる。効率よく微生物ゲノムが全抽出された場合、微生物存在比および機能の多様性を理解するための強力なツールとなると期待されている。しかし多くの場合、一部優占種のゲノムにしかアクセスできず(メタゲノム抽出物には一部優占種ゲノムが重複して存在する)生態系のポテンシャルを理解するには至らないと考えられる。また、普通の(特殊環境のように一部の微生物のみから形成される生態系を除いた)生態系にメタゲノム法を適用する場合、得られる遺伝子配列が多様すぎて、生物としての機能の把握に至らないとも考えられる。さらに得られる遺伝子の多くがハウスキーピング遺伝子で、対象生態系の特徴の把握に繋がる遺伝子情報はごく僅かであろう。また、検出された遺伝子が環境中で発現し、機能しているとは限らないという指摘もある。

メタゲノム法は、産業的に有用な遺伝子を獲得するための方法としても期待されている。この方法を用いると、環境中の難培養性微生物のゲノムから、培養を介した方法では得られない新規の有用遺伝子が得られる可能性があると考えられている。しかし、この場合も前述と同様にメタゲノム中の一部優占種微生物のゲノムにしかアクセ

スできず、多様な希少種の遺伝子にはアクセスできないという問題がある。また、この際に用いられるスクリーニング法には次のような問題がある。従来のメタゲノム法では、主に2つのスクリーニング法が用いられてきた。その1つは、酵素活性を指標にしたスクリーニングである。これは、メタゲノムを制限酵素処理などで断片化し、適当な遺伝子発現ベクターに連結した後に、大腸菌などを宿主に形成されたライブラリーから目的の酵素活性を発現している陽性クローンを選別する方法である。この方法は、活性を発現しているクローン（つまり活性発現に必要な遺伝子断片を含むクローン）を確実に選別できるという利点がある。一方、膨大なクローンライブラリーからの活性スクリーニングは大変骨が折れる作業である。発色性のある基質アナログなどが利用できる場合には効率のよいスクリーニングが期待できるが、このようなケースは非常に限定的である。もう一つの問題は、多くの場合、組換え宿主内に活性型の異種微生物酵素を発現させることが難しい点にある。したがって、

この方法では比較的活性が発現しやすい酵素しか得ることはできないと考えられる。2つめのスクリーニング法は、ゲノム断片のクローンライブラリーまたはメタゲノムそのものを鋳型として、既知酵素遺伝子の保存配列をもとに設計されたプライマーやプローブを用いて、PCRやコロニーハイブリダイゼーションなどの手法により目的の遺伝子のスクリーニングを行う方法（遺伝子配列を指標にした方法）である。しかし、この方法は既知酵素の遺伝子配列を基にしている以上、既知酵素に類似の酵素遺伝子をスクリーニングする方法であり、得られてくる遺伝子配列の新規性に大きな期待を抱くことはできない。

以上に示したよう、メタゲノム法は様々な問題を含むものであり、その主なものを図1にまとめた。そこでこれらの問題をの解決に貢献すべく、筆者らは微生物集団の機能解析やその中の未知有用遺伝子の探索を目指したメタゲノムアプローチにおいて有用な新規手法の開発を行っている。図2には、我々が近年開発した手法のメタゲノム法における位置づけを示す。本稿でははじめに、従来のスクリーニング方法では獲得が困難な未知有用遺伝子を獲得する方法として遺伝子発現活性を指標にした方法（Substrate Induced Gene Expression: SIGEX法¹³）を、次にメタゲノムから希少種DNA配列の周辺領域をクローン化するための新規PCR法（Inverse Affinity Nested PCR: IAN-PCR¹⁴）を紹介する。さらに、従来のスクリーニング方法では見落とされていた希少遺伝子へアクセスする方法（Preferential Annealing and Removal of Major Metagenome fragments: PARM法）、微生物集団内で発現している遺伝子を解析（community transcriptome法）す

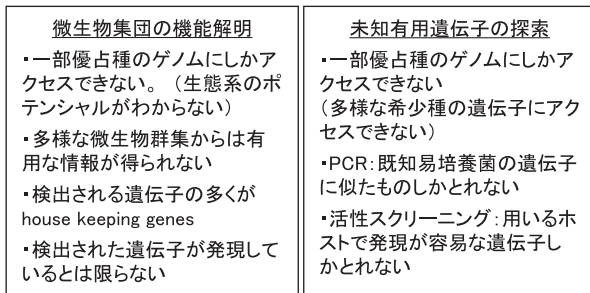


図1. メタゲノム法の問題点。

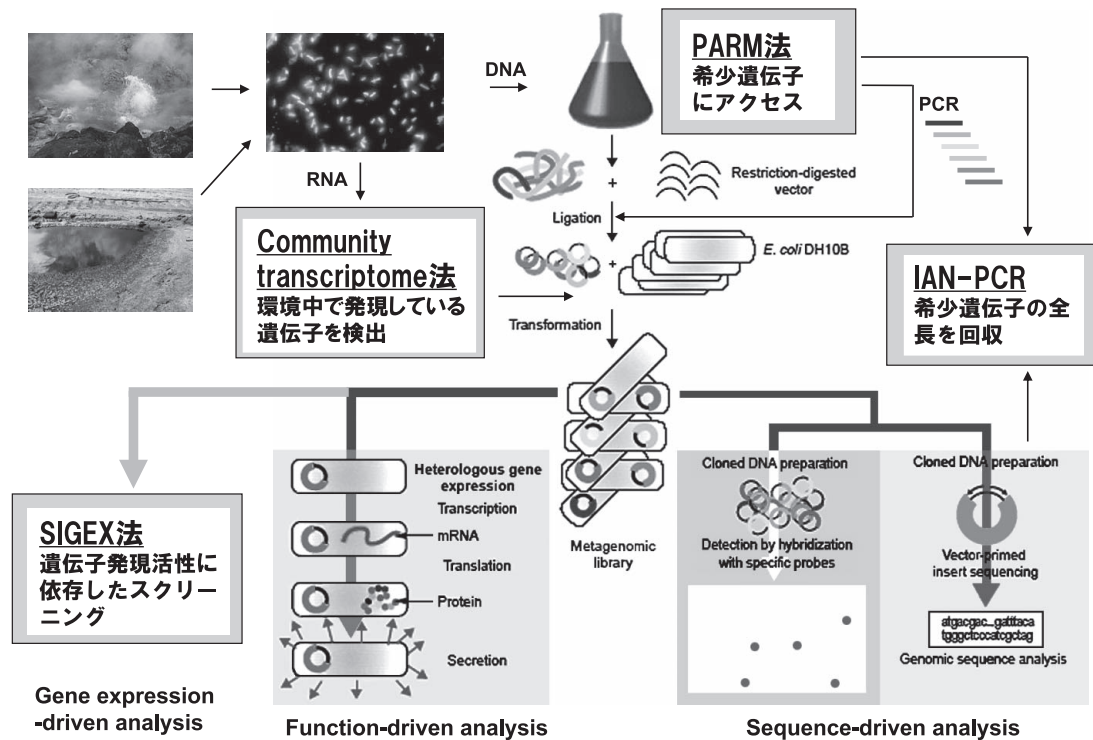


図2. 本稿で紹介するメタゲノム法の相関関係。

る方法を紹介する。

3. 遺伝子発現活性に依存したスクリーニング: SIGEX

SIGEX が従来のスクリーニング法と根本的に異なる点は、遺伝子発現活性をスクリーニングの指標としていることである。これは、「多くの代謝系酵素はその基質や反応生成物などに依存して誘導的に発現する」、「原核生物の代謝系遺伝子の多くがオペロンを形成しており、発現制御因子は代謝系酵素遺伝子の近傍にあることが多い」という2つの知見に基づいている。この方法においては、部分消化したメタゲノムのショットガンライブラリーから目的の遺伝子クローンをスクリーニングする従来法と同様の流れをとるが、ライブラリーを構築する際に用いるベクターに特徴があり、またスクリーニングにはフローソーティングを用いることでハイスループット化が図られている(図3)。

SIGEX に用いるベクターは、p18GFP である。これは大腸菌で一般的に用いられる pUC18 のマルチクローニングサイトに green fluorescent protein (gfp) 遺伝子を挿入したものであるが、二つの工夫を施してある。一つは、インサートがクローン化されていない状態のベクターでは、lac プロモーターによって GFP の発現がコントロールされるように構築したことである。二つめは、gfp 遺伝子上流にクローン化された遺伝子と GFP が融合タンパクを形成しないように、gfp 遺伝子上流のすべての読み枠に終止コドンを入れたことである。SIGEX 法では、対象とする基質を遺伝子発現誘導基質として GFP を発現するクローンを、フローサイトメーターを用いたソーティングにより分取する(図2)。フローソーティングを用いることで、毎秒約 5000 個もの細胞から GFP 発現細胞を選別できる。これにより、例えば 1,000,000 細胞を含むライブラリーのスクリーニングが僅か数分で終了するように、かなりのハイスループット化が図られている。

SIGEX 法を環境メタゲノムに適用した例として、以下に石油汚染地下水メタゲノムから新規代謝系オペロン

を取得した例¹³⁾を概説する。この実験においては、まず地下水からゲノムを抽出し、インサートの平均長が 7 kb のメタゲノムライブラリー (152,000 クローン) を構築した。このライブラリーから芳香族炭化水素分解系オペロンを得るために、芳香族分解系の重要な中間代謝産物である安息香酸などを基質に用いた SIGEX 法によりスクリーニングを試み、62 個の陽性クローンを得た。これらは、制限酵素切断パターン解析から 35 種類の遺伝子断片に分類された。これらの塩基配列を決定し、それぞれにコードされている ORF を予測した結果、得られた遺伝子断片には代謝系酵素をコードすると予想される ORF が数多く含まれていることが示された¹³⁾。

安息香酸により発現が誘導された遺伝子断片の一つ、Bzo71 には細菌のシトクロム P450 に低い相同性 (29%) を示す ORF (Bzo71-8) が含まれていた¹³⁾。P450 は活性部位にヘムを持つ水酸化酵素ファミリーの総称である。P450 は生物に幅広く存在し、その大きな特徴として基質が非常に多岐にわたることがあげられる。最近ではゲノムプロジェクトにより数多くの P450 様遺伝子が発見されているが、その機能がわかっているものは非常に少ない。つまり従来の遺伝子配列や酵素活性に依存したスクリーニング方法では新規機能をもつ P450 を得ることは非常に困難であるといえる。Bzo71-8 にコードされる P450 様遺伝子はその後の解析の結果、4-ヒドロキシ安息香酸の 3 位をヒドロキシル化する酵素をコードすることがわかった¹³⁾。このような反応を触媒する P450 の報告はなく、全くの新規酵素といえる。

新規 P450 の機能が判明したのは、SIGEX スクリーニングの際に用いた誘導基質である安息香酸の類似化合物の変換を調べることができたからである。P450 は、活性発現に電子伝達タンパク質を必要とすることなどから、酵素活性を指標にしたスクリーニング法を適用するのが極めて困難な酵素である。また、メタゲノム中に新規配列の P450 が含まれることが分かっても、その基質を解明することは極めて困難である。このようなことが原因で、新規性の高い P450 がメタゲノム法により得られた例は過去にない。このような状況を総合的に考える

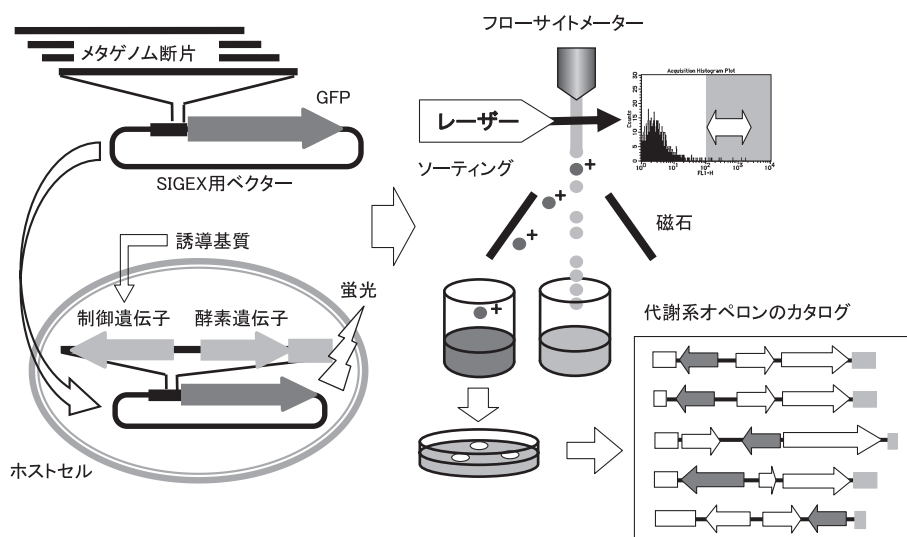


図3. SIGEX 法のスキーム。

と、SIGEX 法は新規機能をコードする遺伝子を取得するための強力なツールであると言える。ただし、SIGEX にも長所・短所があるので、それらを十分に把握したうえで使用していくことが必要である。

4. 希少遺伝子の全長を回収：IAN-PCR

前述の SIGEX 法ではメタゲノムを部分消化しショットガンライブラリーを作製しているため、得られたクローンがオペロン全長をクローン化しているとは限らない。得られた既知 DNA 配列を基にメタゲノムから周辺領域をクローン化する方法として IAN-PCR を行うことでオペロン全体を得ることが可能となる。既知 DNA 配列の周辺領域をクローン化する方法として Inverse PCR が知られているが、一般に多様なメタゲノム中の低コピー遺伝子からの増幅は困難である。Inverse PCR に Nested PCR を組み合わせると比較的 low コピーの遺伝子の増幅が可能となるが、これにも限界がある。そこで筆者らは、affinity tag をつけたプライマーで Inverse PCR を行い、affinity 精製により狭雑 DNA を除去した後に Nested PCR を行った。この方法のスキームを図 4 に示す。その結果、Inverse PCR のみでは存在比が 10^{-1} コピー、また Inverse PCR と Nested PCR を組み合わせた方法では 10^{-3} コピーが増幅の下限であるのに対し、affinity 精製を組み合わせた場合では 10^{-5} コピーの遺伝子からも増幅できることが確認された¹⁴⁾。このことから、従来の PCR 法では得ることができなかった低コピー遺伝子を増幅することが示され、この方法を用いれば多様な遺伝子が得られると期待されている。

5. 希少遺伝子へアクセス：PARM 法

メタゲノム法を用いた新規遺伝子の探索は、近年急速に普及してきている。通常のメタゲノム法では、メタゲノムを何らかの方法でクローニングし、有用遺伝子を含

むクローンをスクリーニングする。この方法ではメタゲノムをランダムにクローニングするため、ライブラリーにおけるクローンの種類は環境中の微生物の存在比に影響される。例えば、ある環境中で少数の微生物が優占化している場合、この環境から作成されたメタゲノムライブラリーには、少数の優占化微生物由来のゲノム断片を含むクローンで占められてしまうことになる。一方、多様な未知遺伝子資源にアクセスしたければ、優先種由来の反復ゲノム断片を排除し、希少種由来のゲノムを多く含むメタゲノムライブラリーを作成する必要がある。そこで筆者らは、優占種由来の重複ゲノム断片を排除し希少ゲノムにアクセスする方法として PARM (Preferential Annealing and Removal of Major Metagenome fragments) 法を開発した。

PARM 法は、メタゲノム中に大量に存在するゲノム断片を選択的に除去することにより、相対的に希少微生物由来のゲノム断片の存在比（割合）を高める方法である。この処理を行った後のメタゲノムライブラリーからスクリーニングを行うことで、希少微生物由来の多様な未知遺伝子にアクセスできるようにするものである。この方法は、Cot 解析の理論¹⁾に基づく。この理論ではコピー数が多い DNA ほど変性後の 2 本鎖形成が速いため、メタゲノムを適当な条件で 1 本鎖にした後に 2 本鎖を再形成させ、形成した 2 本鎖 DNA を適当な方法で分離・除去すれば、元来のメタゲノム中で少数派であった DNA の割合が高まる。この点は従来の標準化法と同様である。しかしこの場合、多数派微生物由来遺伝子と少数派微生物由来遺伝子の存在比が逆転することは無く、最高にうまくいっても同程度になるのみである。そこで PARM 法では、多量微生物由来と少数微生物由来の遺伝子の存在比を逆転するために、以下のテクニックを導入した（図 5）。まず、メタゲノムを少量と多量に 2 分し（1:9 程度）、制限酵素処理によって少量画分は長い DNA 断片に、多量画分は短い DNA 断片にする。前者をターゲット DNA、後者をドライバー DNA とし、

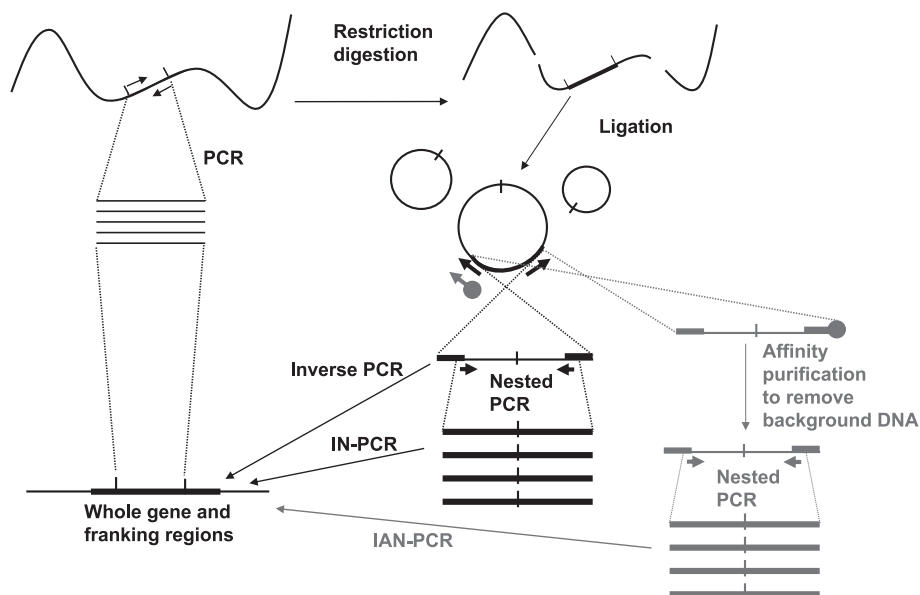


図 4. IAN-PCR (赤の部分) のスキーム。

ドライバー DNA はビオチンで標識する。どちらも熱処理で 1 本鎖にした後ターゲット DNA とドライバー DNA を混合し、ハイブリダイズさせる。ドライバー DNA およびドライバー DNA とハイブリダイズしたターゲット DNA をビオチン-アビジン相互作用を利用して除去する。その後、残りのターゲット DNA 再度 1 本鎖にした後、再びドライバー DNA を混合してハイブリダイズさせ、同様にドライバー DNA およびドライバー DNA とハイブリダイズしたターゲット DNA を除去する。これを繰り返すことにより、メタゲノム中の多量微生物由来遺伝子を除去し、希少微生物由来のゲノム断片の割合を高めることができる (図 5)。

ターゲット DNA とドライバー DNA をハイブリダイゼーションさせる場合、多量微生物の持つ遺伝子と少数微生物の持つ遺伝子間の塩基配列相同性が重要になる。相同性が高い場合、多量微生物遺伝子と少数微生物遺伝子との間で異種 2 本鎖が形成され、少数微生物遺伝子まで除去されてしまう可能性がある。例えば、16S rRNA 遺伝子は保存性が高いために PARM 法により希少種を残すのが難しいが、代謝系酵素遺伝子などは効率良く希少種が集積される。つまり、PARM 法により orthologous な遺伝子は除去されやすく、機能的に珍しい遺伝子は残存しやすい。また、G+C 含量の高い遺伝子断片は残されやすい。現在、環境メタゲノムを用いて PARM 法を適用し、本方法の有効性を示すとともに新規遺伝子の取得を目指し検討を行っている。

6. 環境中で発現している遺伝子を検出：community transcriptome 法

DNA をターゲットとしたメタゲノム解析では、現場で機能（発現）していない遺伝子が存在するために、微生物群集の機能を正しく理解できない可能性がある。そ

ここで我々はメタゲノム解析と同様の観点により、環境中の mRNA をターゲットとした網羅的解析 (Community transcriptome) をおこなうことで、環境中で実際に機能している遺伝子の特定、取得が可能になると考えた。しかし環境微生物群集の発現遺伝子の網羅的解析においては、(1) 十分な質・量を有する RNA の取得が困難、(2) 全 RNA 中に含まれる mRNA の割合が低い (一般的に数%程度)、(3) (RT-) PCR に使用するプライマーに依存したバイアスの存在、といった克服すべき課題が存在する。微生物をターゲットとした Community transcriptome に関する報告は、現在まで非常に限られている。Poretsky ら⁷⁾ は海洋微生物群集に Community transcriptome を適用し、得られた cDNA クローンライブラリのシーケンス解析をおこない様々な系統の微生物に由来する転写産物を取得している。しかしこの方法には大腸菌の SD 配列をもとに設計したプライマーが PCR に使用されたなど、問題点も見受けられる。そこで我々は原油分解海洋性細菌群集を対象として、既知の配列情報に非依存的でバイアスの少ない Community transcriptome 法の構築を試みた。

今回適用した方法の概要を図 6 に示す。全 RNA からの mRNA の効率的な濃縮法として、磁性ビーズ結合オリゴヌクレオチドプローブをもちいたハイブリダイゼーション法を適用した (ステップ 3)。このプローブは細菌の 16S および 23S rRNA の保存領域に対して相補的な配列を有しており、全 RNA の大部分を占める rRNA の除去が可能である。また抽出した RNA の 3' 末端に対してポリ A 付加反応をおこない、逆転写反応にオリゴ dT プライマーを使用することで、プライマー配列に依存したバイアスの軽減を図った (ステップ 2 & 4)。またポリ A を付加することにより、少量の RNA サンプルから in vitro transcription による RNA の増幅反応²⁾をおこなうことが可能になり、十分な RNA 量の確保が

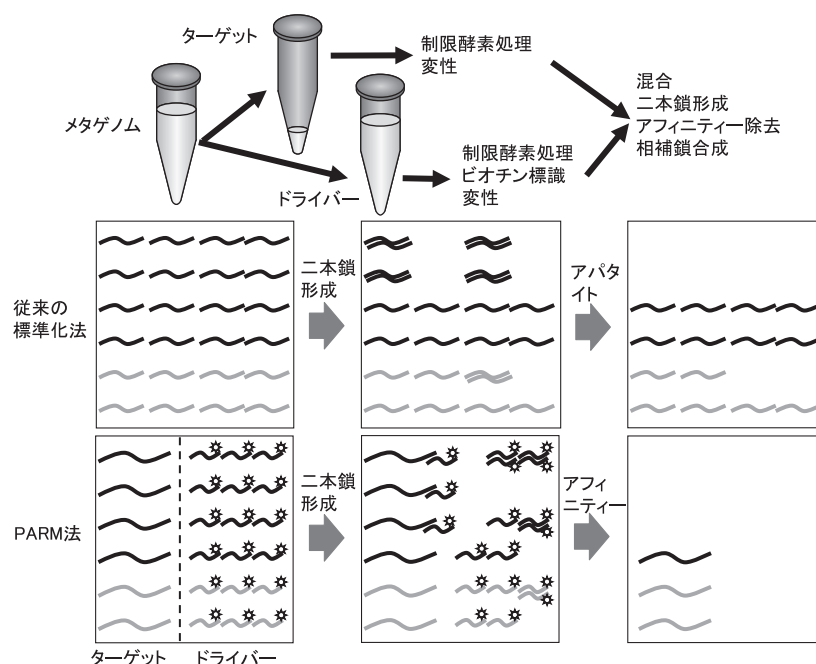


図 5. PARM 法。

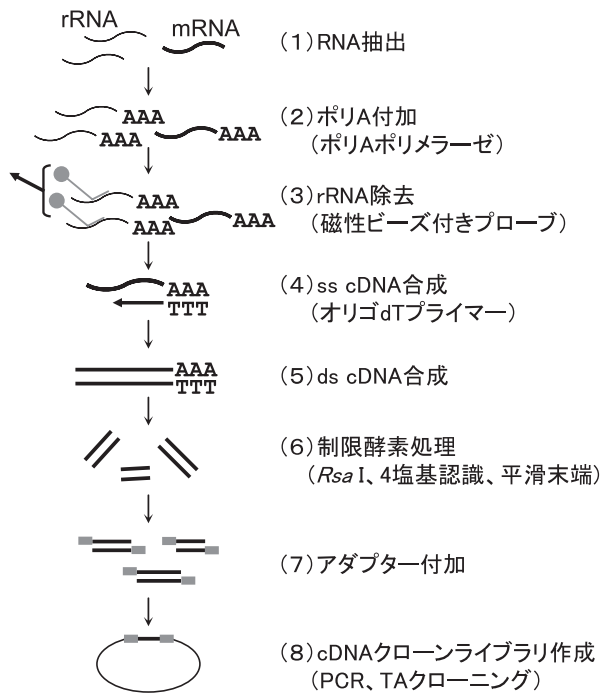


図 6. Community transcriptome 法。

困難なサンプルに対しても適用が可能になる。さらに2本鎖 cDNA 合成後に制限酵素処理およびアダプター付加をおこない、クローニングの際の PCR にアダプター配列由来のプライマーを使用することで、プライマー配列に依存したバイアスを軽減した (ステップ 5-8)。

はじめに海洋性アルカン分解細菌 *Alcanivorax borkumensis* SK2 株¹⁵⁾ 純粋培養系による原油分解過程をモデルとして使用し、上記手法の妥当性を評価した。rRNA 除去 (ステップ 3) をおこなわずに作成した cDNA クローンライブラリではそのほとんど (20/21) が rRNA 由来であったが、図 6 の方法で作成したライブラリでは、rRNA 由来の配列は約 29% (13/45) にまで抑えられており、rRNA 除去の効果が確認された。また原油分解時のライブラリーからは、アルカン分解産物の代謝経路 (プロピオニル CoA 経路) の遺伝子、プロテオーム解析⁷⁾ でアルカン分解時に発現が上昇することが確認されているトランスポーターの遺伝子、電子伝達経路の遺伝子 (キノン酸化還元酵素, キノン合成系遺伝子) が検出された。

次にこの Community transcriptome 法を原油分解海洋性細菌群集に適用した。cDNA クローンライブラリの解析の結果、rRNA 由来配列が約 45% (32/70) と純粋培養でのモデル系と比較して高頻度で検出された。これは RNA 分解などによりサンプル RNA の純度がいくぶん低下したためと考えられる。残り 38 の mRNA 由来クローンに関してデータベース検索をおこなった結果、約 71% (27/38) が *A. borkumensis* SK2 株の遺伝子と最も相同性が高かった。*A. borkumensis* は海水での原油分解過程において優先化する細菌であることが既に報告されている^{6,8)} が、同時に抽出した DNA ベースによる rRNA 遺伝子のクローンライブラリ解析結果では *A. borkumensis* と近縁なクローンは約 36% (5/14) にとどまった。この結果は Community transcriptome 法によ

り活性の高い細菌由来の遺伝子が DNA ベースの方法に比べて高頻度で検出できることを示唆している。ここで検出された遺伝子の中には *A. borkumensis* SK2 株の原油乳化に関連すると予想されるリポ多糖合成系遺伝子、アルカン分解条件下で発現が上昇すると報告されている¹⁵⁾ トランスポーター、malic enzyme の遺伝子も含まれていた。

以上により、本研究で構築した Community transcriptome 法が生態系内で発現されている遺伝子の解析法として有効であることが示された。ただしまだいくつかの課題も存在する。環境中での低い微生物活性による RNA の量・質の低下は、本方法の rRNA 除去の効率低下につながると予想される。今後 rRNA 除去方法の改善などをおこなっていく必要がある。また検出された遺伝子には核酸合成、DNA 複製、翻訳などのハウスキーピング遺伝子も多く含まれており、微生物群集の機能推定や有用遺伝子の取得を可能にするためには、本方法で構築したライブラリーからハウスキーピング遺伝子を除去するような方法を適用することが重要であると考えられる。

7. おわりに

メタゲノム解析に関する論文が最初に発表された当時は、環境中に潜む未知機能を発掘できるものとしてメタゲノムが注目された。しかし、ゲノム解析から膨大な情報が抽出されてくればそのなかに一つや二つ興味深い遺伝子情報がふくまれているのは当たり前であり、なんら驚くことはないのである。逆に機能の分らない遺伝子配列がデータベースを占有し、分子生物学的解析の妨げになるという危惧もある。メタゲノム法が真に有用なものになるためには、解読された配列の大部分の機能が責任をもって解明され (現状ではアノテーションが怪しいものも非常に多い)、それにより生態系内の機能的連携などに関する示唆が得られるようにならなければならない。これはかなり先になりそうで、そのような意味から筆者らは、現時点において網羅的配列解読のメタゲノム解析を行うことに否定的である。ただし、そのコンセプトは極めて重要であり、実りあるものにするための技術開発を怠ってはいけないと思う。

謝 辞

本研究をサポートしていただいた NEDO に感謝いたします。また、実験を補助していただいた沼崎房子さん、佐藤緑さん、泡淵宏美さんに感謝いたします。

文 献

- 1) Britten, R.J., and D.E.Kohne. 1968. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science* 161: 529-540.
- 2) Chenchik, A., Y.Y. Zhu, L. Diatchenko, R. Li, J. Hill, and P.D. Siebert. 1998. Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR, pp. 305-319. In *Gene Cloning and analysis by RT-PCR*. BioTechniques

- Books, MA, USA..
- 3) Gillespie, D.E., S.F. Brady, A.D. Bettermann, N.P. Cianciotto, M.R. Liles, M.R. Rondon, J. Clardy, R.M. Goodman, and J. Handelsman. 2002. Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4301–4306.
 - 4) Handelsman, J., M.R. Rondon, S.F. Brady, J. Clardy, and R.M. Goodman. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5: 245–249.
 - 5) 星野（高田）裕子, 長谷部亮. 2005. 土壌からの DNA 抽出法. *J. Environ. Biotechnol.* 5: 43–53.
 - 6) Kasai, Y., H. Kishira, T. Sasaki, K. Syutsubo, K. Watanabe, and S. Harayama. 2002. Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. *Environ. Microbiol.* 4: 141–147.
 - 7) Poretsky, R.S., N. Bano, A. Buchan, G. LeClerc, J. Kleikemper, M. Pickering, W.M. Pate, M.A. Moran, and J.T. Hollibaugh. 2005. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4121–4126.
 - 8) Roling, W.F., M.G. Milner, D.M. Jones, F. Fratapietro, R.P. Swannell, F. Daniel, I.M. Head. 2004. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2603–2613.
 - 9) Rondon, M.R., P.R. August, A.D. Bettermann, S.F. Brady, T.H. Grossman, M.R. Liles, K.A. Loiacono, B.A. Lynch, I.A. MacNeil, C. Minor, C.L. Tiong, M. Gilman, M.S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, and R.M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2541–2547.
 - 10) Streit, W.R., and R.A. Schmitz. 2004. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 492–498.
 - 11) Torsvik, V. 1980. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol. Biochem.* 12: 15–21.
 - 12) Torsvik, V., and L. Ovreas. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240–245.
 - 13) Uchiyama, T., T. Abe, T. Ikemura, and K. Watanabe. 2005. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nature Biotechnol.* 23: 88–93.
 - 14) Uchiyama, T., and K. Watanabe. 2006. Improved inverse PCR scheme for metagenome walking. *Biotechniques* 41: 183–188.
 - 15) Yakimov, M.M., P.N. Golyshin, S. Lang, E.R. Moore, W.R. Abraham, H. Lunsdorf, and K.N. Timmis. 1998. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 339–348.