植物病原微生物におけるゲノミクス

菊地 泰生^{*,1}

菊地泰生：植物病原微生物におけるゲノミクス 日林誌 87：251~260, 2005 近年、多くの植物や植物病原微生物を対象にゲノムワイドな解析が取り組まれるようになってきた。これらの解析は植物病理学分野に新鋭の研究手法を提供している。本稿では、バクテリア、糸状菌、線虫などの植物病原微生物におけるゲノミクス研究の現状と展望について概説するとともに、重要な植物寄生線虫であるマツノザイセンチュウを対象とした EST (Expressed Sequence Tag) プロジェクトについて紹介する。

キーワード：EST, ゲノム, 植物病原, マツノザイセンチュウ

Kikuchi, T.: **Genomics of Plant Pathogenic Microbes.** J. Jpn. For. Soc. 87: 251~260, 2005 Genome sequencing efforts have been initiated recently for many plants and plant pathogenic microbes. These efforts are providing a new and powerful means of investigating plant pathogens. Here we briefly review the current status and future prospects of genomics in plant pathogenic microbes, including bacteria, fungi and nematodes. We also describe our EST (Expressed Sequence Tag) project on the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*.

Key words: EST, genomics, plant pathogen, the pine wood nematode

I. はじめに

2003年4月にヒトゲノムの精密配列読取り完了宣言があったことは記憶に新しい(17)。1995年に最初のゲノム配列としてインフルエンザ菌 *Haemophilus influenzae* (11) の全ゲノム配列が公表されて以来、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (32)、線虫 *Caenorhabditis elegans* (52)、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (2)、シロイロナズナ *Arabidopsis thaliana* (3) のゲノム配列が相次いで解読、発表された。ゲノムの解読は当初、これらのモデル生物といわれるものを対象に行われていたが、最近幅広い生物種で解析が行われるようになってきており、2004年10月の時点で、NCBI (National Centre for Biotechnology Information) で公表されている全ゲノム配列が解読された生物は600種を超える (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/index.html>)。

これらのゲノミクス研究の広がりには農業分野にも例外ではなく、イネ(2004年12月に完全解読終了)(13, 64)に代表される作物種のゲノムやイネいもち病菌に代表される植物病原菌のゲノムが解読されるなど、多くの農業上重要な生物種がゲノム解析の対象となり始めている(28)。本稿では、バクテリア、菌類、線虫などの植物病原微生物(注1)のゲノム解析の現状と展望について概説するとともに、森林総合研究所で行っているマツノザイセンチュウを対象とした EST プロジェクトについて紹介したい。

II. ホールゲノムショットガン法, EST 解析法

ゲノミクス研究の広がりにはいくつもの重要な技術開発があった。パルスフィールド電気泳動, YAC (注2)ベクターの開発, 耐熱性ポリメラーゼによる PCR (注3)技術, さらにはキャピラリー式自動シーケンサーをはじめとする解析機器の自動化・高速化, 情報処理技術の発達など、どれも欠かせない技術であった(33)。その中でもホールゲノムショットガン(WGS)法の成功はゲノミクス研究に格段の加速をもたらしたといえる。また, Expressed Sequence Tag (EST) 解析は全ゲノムの解読までに至らない多くの生物種でのゲノム情報の増加に大きく貢献している。ここでは WGS 法と EST 解析法について簡単に紹介しておく。

1. ホールゲノムショットガン

1995年に Venter 博士が The Institute for Genomic Research (TIGR) を率いてインフルエンザ菌のゲノム配列を解読したとき、使用した方法が WGS 法であった。WGS 法は全ゲノム DNA をショットガンで打ち砕くようにランダムに断片化し、その断片をクローニングして DNA 配列を読み取り、断片同士のわずかな重なりを手がかりに、コンピュータ上でもとの全 DNA までつなぎ戻し(アセンブル)をするという手法である。この方法はこれまでのゲノム配列決定の方法を根本的に変えることになった。従来の方法では断片化、クローニング、マッピングを

* 連絡・別刷請求先 (Corresponding author) E-mail: kikuchit@affrc.go.jp

¹ 森林総合研究所 (305-8687 つくば市松の里 1)

Forestry and Forest Products Research Institute, 1 Matsunosato, Tsukuba 305-8687, Japan.

Abbreviations: NCBI, National Centre for Biotechnology Information; WGS, Whole genome shotgun; EST, Expressed sequence tag; GHF, Glycosyl hydrolase family.

(2005年1月21日受付; 2005年2月22日受理)

繰り返す作業を介して配列決定を行っていたが、WGS法はこの中間のステップを全く省略するという意味で画期的であり、理論的には従来の方法と比べてかなり短い時間でゲノムの解読が可能である。

WGS法をサイズの大きなゲノムに適用するのは難しいのではないかという懐疑的な意見も多かったが、Venter博士はその後、Cerela Genomics社を興し、1999年に解析のめどが全く立っていなかったショウジョウバエのゲノム配列(115 Mb)をWGS法を用いて、わずか3カ月で読み切り、さらに2000年には3Gbのヒトゲノムをほぼ(ドラフト配列)解読し、WGS法の有用性を実証した。

WGS法ではゲノムサイズが大きくなると高精度配列を得ることが難しくなるという難点はあるものの、すばやくゲノムを概観するには最適で、特に小さいサイズのゲノムの解読には大変有効な方法であるといえる。現在では、中程度以下のサイズのゲノムの解読は、ほぼ例外なくWGS法を使用して行われている。なお、WGS法の詳しい手法については優れた総説があるのでそちらを参考にして欲しい(27, 34)。

2. Expressed Sequence Tag 解析

シーケンス技術が高度化し、解析機器類の技術革新が目覚ましいとはいえ、全ゲノム配列を解読するにはやはり莫大な費用と大きな設備が必要であり、個々のラボが容易に取り組めるものではない。ゲノムサイズの大きい真核生物については特にそれがあてはまる。EST解析は比較的小規模な設備で、低コストかつ迅速に遺伝子配列を取得することができるため、現在、多くの真核生物を対象としてESTプロジェクトが行われている。

ESTとはcDNAの末端配列を網羅的に収集したものである。具体的な解析手法としては、まず、解析したい生物あるいは器官からmRNAを精製し、cDNAライブラリーを作成する。さらにcDNAライブラリー内のクローンをランダムにピックアップし、プラスミドを精製した後、一方向から(多くの場合5'端から)1回だけシーケンス解析を行い、波形データを取得する。得られた波形データはコンピューター上で精度の低い部位やベクター配列の除去等の整形が行われ、テキストベースのEST配列としてデータベースに登録される。こうして得られたESTはおおよそ300~700 bp程度の短い配列情報であるが、これまでに蓄積された膨大な遺伝子配列情報データベースに対しホモロジー検索を行うことにより、ある程度の機能推定が可能である。ESTはこのようにcDNAを解析対象とするため、真核生物のゲノムの大部分を占めるイントロンなどの非翻訳領域(注4)を解析から排除して、タンパク質をコードする部位の配列を効率よく網羅することができる。

EST解析は単独で行われるだけでなく、全ゲノムが解読された(あるいは計画中の)生物種においても取り込まれる。これはESTがゲノム内のタンパク質をコードする部位(遺伝子部位)の同定に重要な情報を与えることができるためである。特に完全長のcDNAのデータはプロモ-

ーター領域や転写開始点を把握し、ゲノム配列のアノテーション(注5)を行うのに大変有効であり、組換えタンパク質の発現にも利用できることから、多くの生物種で完全長cDNAの収集が精力的に行われている(16, 22, 23, 45)。

ESTの多くはNCBIのデータベースdbESTに登録され、公開されている(www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/を参照)。2004年9月の時点で、ヒトでの600万個、マウスでの420万個などを筆頭に、500種以上の生物からの2,400万を超えるESTが登録されている。各研究者はこれらのデータの中から興味を持った配列に特異的なプライマーを作成し、容易に遺伝子のクローニングを行うことができる。

ESTはこのように大変有用な解析法であるが、EST解析を行う際、あるいはデータを利用する際にはいくつかの注意も必要である。第1に、個々のESTデータは一方向から1回だけ解析された配列データであるため、正確なものではなくエラーを含んでいる可能性があること。第2にライブラリーの品質が結果に大きく作用すること。コンタミネーション(汚染)した材料や分解の進んだ材料から作られたcDNAライブラリーから得られたESTは信頼性の乏しいものになる。第3に発現による偏りがあること。生物の発育状況や部位によって発現しているmRNAの種類は大きく異なるため、たくさん発現している遺伝子はESTとして大量に得られるが、発現量の少ない遺伝子はESTデータとして得ることは難しい。この偏りを補正するために、異なる発育ステージ、異なる器官などから出発した複数のcDNAライブラリーの使用や、平均化(normalization)処理を行ったライブラリーの使用などの工夫がなされている。また、獲得されたEST配列をアセンブルした後、各アセンブルを一つの配列(unigene)としてデータベース化することで重複を解消し、配列データの利用やホモロジー検索がストレスなく行える環境を提供するといった工夫もなされている。

III. 植物病原微生物におけるゲノム解析の現状

1. 細菌類

植物病原微生物として最初にゲノムが解読されたのは、ブラジルの研究グループによる柑橘斑入病の病原細菌 *Xylella fastidiosa* (46) のものであった。その後、根頭がんしゅ病菌 *Agrobacterium tumefaciens* (14, 60)、ナス科青枯病の病原細菌 *Ralstonia solanacearum* (43) などの細菌においてもゲノム配列が解読された(表-1)。2004年には東京大学のグループによって細菌よりも小さいゲノムを持つファイトプラズマのゲノムが解読された(37)。WGS法の利用と解析機器の高度化に伴い、細菌などの微生物のゲノム配列は格段に増加している。ごく最近では海洋中からの微生物群がまとめてゲノム解読される(1,800種を解読と発表)(57)など、その増加は著しい。ゲノムサイズが1 Mbから10 Mbと小型な微生物(図-1)のゲノム配列は、大規模なシーケンシングセンターで行われれば、ごく短い期間での解読が可能である。細菌などの微生物の

表-1. 植物病原細菌でのゲノムプロジェクト

種	株	ゲノムサイズ (Mb)	状況	解析機関 ^a	参考文献
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58	5.67	Completed	GSC	(60)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58 (Cereon)	5.67	Completed	Cereon	(14)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	J2315	8.1	In progress	Sanger	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	NCPBP382	~3.3	In progress	The Competence Network	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	—	~2.6	In progress	Sanger	
<i>Erwinia amylovora</i>	—	—	In progress	Sanger	
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	SCRI1043	5.06	Completed	Sanger	
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	3937	3.7	In progress	TIGR/University of Wisconsin	
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	CTCB07	2.58	Completed	Sao Paulo State Consortium, Brazil	
<i>Onion yellows phytoplasma</i>	OY-M	0.86	Completed	The University of Tokyo, Japan	(37)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	1448A	6.54	Completed	TIGR	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	B728a	5.6	Draft	DOE Joint Genome Institute	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	6.4	Completed	TIGR	(6)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	—	5.8	Completed	Genoscope, France	(43)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	3841	7.74	In progress	Sanger	
<i>Spiroplasma kunkelii</i>	—	1.48	In progress	University of Oklahoma	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>	—	—	In progress	Sao Paulo State Consortium, Brazil	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	306	5.27	Completed	Sao Paulo State Consortium, Brazil	(8)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ATCC33913	5.08	Completed	Sao Paulo State Consortium, Brazil	(8)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	8004	~5.0	In progress	Chinese National Human Genome Center	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	B100	—	In progress	The Competence Network	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	31321	—	In progress	The Competence Network	
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	KACC10331	—	In progress	NIAB, Korea	
<i>Xylella fastidiosa</i>	9a5c	2.7	Completed	Sao Paulo State Consortium, Brazil	(46)
<i>Xylella fastidiosa</i> /Pierce's Disease Strain	Temeculal	2.6	Completed	Sao Paulo State Consortium, Brazil	(56)
<i>Xylella fastidiosa</i> -almond	Dixon	2.6	Draft	DOE Joint Genome Institute	
<i>Xylella fastidiosa</i> -oleander	Annl	2.6	Draft	DOE Joint Genome Institute	

^a GSC, Genome Sequencing Center, Washington University, USA; TIGR, The Institute for Genome Research, USA; DOE, Department of Energy, USA; NIAB, National Institute of Agricultural Biotechnology, Korea.

図-1. 様々な分類群におけるゲノムサイズ (半数体当りの塩基対数)

研究分野においてはゲノム配列はすでに特別なものではなく、基本的なオプションの一つになったと考えるべきであろう。細菌類では動物病原性細菌や共生菌も含めて、多くのゲノムデータが揃い、病原性に関与する遺伝子群 (*hrp* 遺伝子群や *avr* 遺伝子など) は病原性細菌のみが有しており、こうした遺伝子は水平転移によってゲノム間を移動することが明らかになっている (4)。

また、マメ科植物に寄生 (共生) し、窒素固定を行う根粒バクテリアについてもゲノム解析が進んでおり、ミヤコ

グサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*)、ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)、アルファルフ根粒菌 (*Sinorhizobium meliloti*) など全ゲノムが解読され、根粒菌に特徴的なゲノム構造が明らかとなってきた (21)。

2. 菌 類

1996 年に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のゲノムが解読されて以降、菌類でのゲノム解析は他の生物種に比べてやや遅れ気味であったが、糸状菌ゲノム解析プロジェクトが Whitehead 研究所を中心に開始され、アカパンカビ *Neurospora crassa* (12), *Aspergillus nidulans*, 人体寄生菌 *Coccidioides immitis* などのゲノムがドラフトレベルで解読された (表-2)。重要な植物病原菌も解析対象になっており、2002 年にイネいもち菌 *Magnaporthe grisea* のゲノムが解読されたのを皮切りに、赤カビ病菌 *Fusarium graminearum*, 黒穂病菌 *Ustilago maydis* のゲノムもドラフトレベルで解読された (表-2) (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fgi/> を参照)。

菌類では EST 解析も精力的に行われており、*M. grisea* (25, 48), *Phytophthora sojae* (58), *Blumeria graminis* (53), *U. maydis* (36, 42), *F. graminearum* (54) など大量の EST が取得されている (表-3)。また、いくつかの植物病原菌を対象に EST を収集し、データベースを独自に作成することを目的としたプロジェクトも始まっている (COGEME: <http://cogeme.ex.ac.uk/>) (48)。

表-2. 菌類での主なゲノムプロジェクト

種	ゲノムサイズ (Mb)	状況	主たる解析機関*
子囊菌			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	30	In progress	Sanger
<i>Aspergillus nidulans</i>	31	Draft sequence	WICGR
<i>Aspergillus parasiticus</i>	—	In progress	University of Oklahoma
<i>Aspergillus terreus</i>	—	Draft sequence	Microbia
<i>Chaetomium globosum</i>	38	In progress	WICGR
<i>Coccidioides immitis</i>	29	Draft sequence	WICGR
<i>Coccidioides posadasii</i>	29	In progress	Broad
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	—	In progress	University of Oklahoma
<i>Gibberella zeae</i> (<i>Fusarium graminearum</i>)	40	Draft sequence	WICGR
<i>Magnaporthe grisea</i>	40	Draft sequence	WICGR
<i>Neurospora crassa</i>	43	Draft sequence	WICGR
<i>Pneumocystis carinii</i>	—	In progress	WICGR
<i>Uncinocarpus reesii</i>	—	In progress	WICGR
<i>Candida albicans</i>	16	Draft sequence	Stanford DNA Sequencing and Technology
<i>Candida glabrata</i>	12.3	Completed	Genolevures Consortium
<i>Candida guilliermondii</i>	12	In progress	WICGR
<i>Candida lusitanae</i>	13	In progress	WICGR
<i>Candida tropicalis</i>	16	In progress	WICGR
<i>Debaryomyces hansenii</i>	12.2	Completed	Genolevures Consortium
<i>Eremothecium gossypii</i>	9.2	Completed	Genolevures Consortium
<i>Kluyveromyces lactis</i>	10.6	Completed	Genolevures Consortium
<i>Kluyveromyces waltii</i>	11	Draft sequence	WICGR
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	—	In progress	WICGR
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12.2	Completed	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	11.5	Draft sequence	GSC
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	13.8	Completed	Sanger
<i>Yarrowia lipolytica</i>	20.5	Completed	Genolevures Consortium
担子菌			
<i>Coprinopsis cinerea</i>	37.5	Draft sequence	WICGR
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	19	Draft sequence	WICGR
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	30	Draft sequence	DOE Joint Genome Institute
<i>Tricholoma matsutake</i>	40	Draft sequence	DGC, Japan
<i>Ustilago maydis</i>	20	Draft sequence	WICGR
接合菌			
<i>Rhizopus oryzae</i>	40	In progress	WICGR
その他			
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	2.9	Completed	Genoscope

* WICGR, Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, USA; GSC, Genome Sequencing Center, Washington University, USA; DOE, Department of Energy, USA; DGC, Dragon Genomics, Japan.

これらのゲノム情報により、菌類についての包括的な研究が可能になり、比較ゲノム研究や遺伝子の機能研究が一気に加速することが予測される。また、感染時における情報ネットワーク、代謝ネットワークなどの感染メカニズムの理解、さらには菌類における病原性の進化についても理解がもたらされるものと期待されている (29, 63)。

3. 線虫類

線虫類では、モデル生物 *C. elegans* のゲノム配列が1998年に解読された。さらに、*C. elegans* に近縁な *C. briggsae* のゲノム配列が解読され (49)、比較ゲノムのモデルとして期待を受けている。また、動物寄生性線虫であるマレー糸状虫 *Brugia malayi* においてもゲノム解読がほぼ終了している。

線虫類での EST 解析は、他の生物に比べて体系的に行われている。センチュウ類の EST は主に二つのプロジェクトにより行われており、一つは、英国 Edinburgh 大学と Sanger センターによる NemaGene、もう一つは米国 Washington 大学の Genome Sequencing Center (GSC) による NEMBASE である。これらのプロジェクトでは既に 300,000 の EST を解析しており、*C. elegans* の EST などと合わせると 600,000 以上の線虫 EST が公開されていることになる (表-4)。また、今後さらに 100,000 以上の EST の解析が計画されている (38)。Nematode.net (<http://www.nematode.net>) ではこれらの配列へのアクセスを容易にし、ホモロジー検索などを簡単に行えるような環境を提供している (61)。ここで解析対象となっている線虫は

表-3. 菌類における主な EST 解析

種	概要	EST 数 ^a	参考文献
<i>Dictyostelium discoideum</i>	細胞性粘菌	155032	
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	クリプトコッカス症	59041	
<i>Coccidioides posadasii</i>	コクシジオイデス症	53664	
<i>Magnaporthe grisea</i>	イネいもち病菌	53101	(26, 48)
<i>Ajellomyces capsulatus</i> (<i>Histoplasma capsulatum</i>)	ヒストプラズマ症	44349	
<i>Trichoderma reesei</i> (<i>Hypocrea jecorina</i>)	トリコゲルマ属の一種	42197	(7)
<i>Phytophthora sojae</i>	ダイズ茎疫病	28092	(58)
<i>Neurospora crassa</i>	アカパンカビ	28089	
<i>Aspergillus flavus</i>	アフラトキシン産生菌	20371	
<i>Gibberella zeae</i> (<i>Fusarium graminearum</i>)	赤かび病菌	19140	(54)
<i>Emmericella nidulans</i> (<i>Aspergillus nidulans</i>)	コウジカビ	16849	
<i>Ustilago maydis</i>	黒穂病菌	9985	(36, 42)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	分裂酵母	8123	
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	フザレノン-X 産生菌	7517	
<i>Blumeria graminis</i>	イネ科うどんこ病菌	6285	(53)
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	つる枯病菌	5187	(48)
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	ワカフサタケ属の一種	4648	(59)
<i>Cryphonectria parasitica</i>	クリ胴枯れ病菌	4217	
<i>Paxillus involutus</i>	ヒダハタケ	4135	(19)
<i>Pneumocystis carinii</i>	カリニ肺炎	3896	
<i>Glomus intraradices</i>	アーバスキュラー菌根菌	3534	
<i>Metarhizium anisopliae</i>	昆虫寄生菌	3449	
<i>Trichoderma harzianum</i> (<i>Hypocrea lixii</i>)	トリコデルマ属の一種	3300	
<i>Monacrosporium haptotylum</i>	線虫捕食菌	3179	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	出芽酵母	3041	
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	灰色かび病菌	2901	
<i>Aspergillus niger</i>	クロコウジカビ	2533	
<i>Verticillium dahliae</i>	バーティシリウム病菌	2502	
<i>Coccidioides immitis</i>	コクシジオイデス症	2452	
<i>Phytophthora infestans</i>	ジャガイモ疫病菌	2334	(58)
<i>Triphysaria versicolor</i>	菌根菌の一種	2085	
<i>Laccaria bicolor</i>	オオキツネタケ	1919	
<i>Heterobasidion annosum</i>	マツノネクチタケ	1638	(1)
<i>Colletotrichum trifolii</i>	植物炭そ病菌	1630	
<i>Chaetomium globosum</i>	軟腐朽菌 (ケタマカビ)	1557	
<i>Glomus versiforme</i>	菌根菌の一種	1423	
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	昆虫寄生菌	1222	
<i>Conidiobolus coronatus</i>	エントモフトラ症	1144	
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	菌核病菌	791	
<i>Cladosporium fulvum</i>	トマト葉かび病	595	

^a 2004 年 11 月の時点で NCBI dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>) に登録された数。

動物や植物に寄生性をもつものが主体で、新薬やワクチンなどの創薬研究、安全な殺虫剤や抵抗性植物の開発研究への近道として期待されている。また解析対象の線虫は幅広い分類群 (クレード) (注 6) から選ばれており、進化学的に興味深い情報も提供している (図-2)。

植物寄生線虫としてはシストセンチュウ類 (*Globodera* spp., *Heterodera* spp.), ネコブセンチュウ類 (*Meloidogyne* spp.), ネグサレセンチュウ類 (*Pratylenchus* spp.) などが EST の解析対象となっており、2004 年 11 月の時点で、これらの植物寄生線虫からの EST は合計で 120,000 を超える。計画では最終的に約 150,000 個の EST 配列が解析・登録されることになっている (表-4)。これらの EST 解析は線虫が共通して有している一般的な遺伝子の配列はもちろんのこと、これまで線虫でみつかっていなかった遺伝子の発見に特に威力を発揮している。例えば、動物で最初のペクチン質分解酵素 (Pectate lyase) 遺伝子の発見はジャガ

イモシストセンチュウ *Globodera rostochiensis* の EST から得られたものであった (39)。さらに、EST データの中には、別のタイプのペクチン質分解酵素 (polygalacturonase) (18)、植物細胞壁の分解に関与するセルラーゼ (β -1,4-endoglucanase) (47)、植物細胞壁の進展に関与する expansin (41)、植物のシキミ酸経路に関与する chorismate mutase (30) などをコードする遺伝子配列が含まれている。これらの遺伝子も、線虫での発見まで動物での存在が知られていなかった遺伝子である。またこれらの遺伝子は線虫の植物寄生性、病原性への関与が指摘されており、EST がネコブセンチュウ・シストセンチュウでの植物寄生メカニズムの解明に向けて重要な役割を果たしていることがうかがえる。

IV. マツノザイセンチュウ EST プロジェクト

このような状況の中、我々はマツノザイセンチュウ

表-4. 線虫での EST 解析

種	概要	公開された EST 数 ^a	予定 EST 数	Clades ^b	主たる解析機関 ^c
<i>Globodera pallida</i>	ジャガイモシロシストセンチュウ	4378	4378	IVb	GSC, SCRI, WAG
<i>Globodera rostochiensis</i>	ジャガイモシストセンチュウ	5934	5934	IVb	SCRI, WAG
<i>Heterodera glycines</i>	ダイズシストセンチュウ	24438	11500	IVb	GSC
<i>Heterodera schachtii</i>	テンサイシストセンチュウ	2818	3000	IVb	GSC
<i>Meloidogyne arenaria</i>	アレナリアネコブセンチュウ	5171	91500 (all mel sp.)	IVb	GSC
<i>Meloidogyne chitwoodi</i>	コロンビヤネコブセンチュウ	12218	—	IVb	GSC
<i>Meloidogyne hapla</i>	キタネコブセンチュウ	24452	—	IVb	GSC
<i>Meloidogyne incognita</i>	サツマイモネコブセンチュウ	19934	—	IVb	GSC, WAG
<i>Meloidogyne javanica</i>	ジャワネコブセンチュウ	7587	—	IVb	GSC
<i>Meloidogyne paranaensis</i>	コーヒーネコブセンチュウ	3710	—	IVb	GSC
<i>Pratylenchus penetrans</i>	キタネグサレセンチュウ	2048	2048	IVb	GSC
<i>Pratylenchus vulnus</i>	クルミネグサレセンチュウ	2485	unknown	IVb	GSC
<i>Rodopholus similis</i>	バナナネモグリセンチュウ	1154	1154	IVb	GSC
<i>Xiphinema index</i>	ブドウオオハリセンチュウ	9349	9348	I	GSC, SCRI
<i>Ancylostoma caninum</i>	イヌ鉤虫	9331	11500	V	GSC
<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	ヒト・セイロン鉤虫	10651	6000	V	GSC
<i>Ancylostoma duodenale</i>	ヒト・ズビニ鉤虫	0	9500	V	GSC
<i>Ascaris suum</i>	ブタ回虫	39242	25000	III	GSC, ED, PSU
<i>Ascaris lumbricoides</i>	ヒト回虫	1822	6000	III	ED, PSU
<i>Brugia malayi</i>	ヒト・マレー糸状虫	26215	3500	III	FGP, GSC
<i>Dirofilaria immitis</i>	イヌ糸状虫	4005	5000	III	GSC
<i>Haemonchus contortus</i>	反芻動物腸内線虫	21967	5000	V	GSC, ED, PSU
<i>Necator americanus</i>	ヒト・アメリカ鉤虫	4766	~16000	V	ED, Sanger
<i>Onchocerca volvulus</i>	ヒト回旋糸状虫	14974	1230	III	FGP
<i>Ostertagia ostertagi</i>	ウシ腸内線虫	7009	10000	V	GSC
<i>Parastrongyloides trichosuri</i>	フクロネズミ腸内線虫	7963	10000	IVa	GSC
<i>Strongyloides ratti</i>	ネズミ糞線虫	14761	21500	IVa	GSC
<i>Strongyloides stercoralis</i>	ヒト糞線虫	11392	10922	IVa	GSC
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	ヒツジ腸内線虫	4313	~16000	V	ED, Sanger
<i>Toxocara canis</i>	イヌ回虫	4889	5000	III	GSC, ED
<i>Trichinella spiralis</i>	ヒト旋毛虫	10767	23000	I	GSC
<i>Trichuris muris</i>	ネズミ鞭虫	3063	8000	I	ED, Sanger
<i>Trichuris trichuria</i>	ヒト鞭虫	0	8000	I	ED, Sanger
<i>Trichuris vulpis</i>	イヌ鞭虫	3063	3000	I	GSC
<i>Wuchereria bancrofti</i>	ヒト・バンクロフト糸状虫	4847	unknown		GSC
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	自活性	2424	2424	V	GSC
<i>Caenorhabditis elegans</i>	自活性	302074	—	V	NIG, GSC, TIGR, Sanger
<i>Pristionchus pacificus</i>	自活性	8818	12096	V	GSC
<i>Zeldia punctata</i>	自活性	391	1000	IVb	GSC
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	マツノザイセンチュウ	—	10000	IVb	FFPRI
<i>Bursaphelenchus mucronatus</i>	ニセマツノザイセンチュウ	—	3000	IVb	FFPRI
合 計		644423			

^a 2004 年 10 月の時点で公開された数。^b 線虫はリボソーム RNA 遺伝子部位を使用した系統解析により五つグレードに分類された (図-2 を参照)。^c GSC, Genome Sequencing Center, Washington University, USA; SCRI, Scottish Crop Research Institute, UK; WAG, Wageningen University, the Netherlands; ED, University of Edinburgh, UK; PSU, Pathogen Sequencing Unit, Sanger Institute, UK; FGP, The Filial Genome Network, UK; NIG, National Institute of Genetics, Japan; TIGR, The Institute for Genome Research, USA; FFPRI, Forestry and Forest Product Research Institute, Japan.

(*Bursaphelenchus xylophilus*) の植物寄生のメカニズムを分子レベルで探ることを目的として、マツノザイセンチュウ EST プロジェクトを 2003 年より開始した。マツノザイセンチュウはマツ材線虫病 (いわゆる松枯れ) の病因であり、日本および東アジアで最も深刻な森林病害を引き起こしている。マツノザイセンチュウは植物寄生能力を持ち、ネコブセンチュウ・シストセンチュウと同じクレード IVb に分類される (図-2) が、これらのセンチュウとは異なる特徴を持っている。シストセンチュウ・ネコブセンチュウ

は Tylenchida 目に分類され植物への絶対寄生者であるのに対し、マツノザイセンチュウは糸状菌を餌としても生存できる菌食線虫が多く含まれる Aphelenchida 目に分類される。実際、マツノザイセンチュウは菌類を餌として生活することが可能である。また、シストセンチュウ・ネコブセンチュウは植物の根部に寄生するのに対し、マツノザイセンチュウはマツの材内に寄生する。さらに、マツノザイセンチュウは昆虫をベクターとして運ばれるというシストセンチュウ・ネコブセンチュウにはない生態も有している。

図-2. 線虫 rDNA に基づく系統樹

線虫はリボソーム RNA 遺伝子部位を使用した系統解析により五つのクレードに分類された (5, 10)。(Nematode.net より引用)

我々のプロジェクトではマツノザイセンチュウおよびその近縁なニセマツノザイセンチュウ (*B. mucronatus*) から 2006 年までの 3 年間でおよそ 15,000 の EST を獲得しデータベース化する計画になっている。これまでにマツノザイセンチュウまたはニセマツノザイセンチュウから作成された数種類の cDNA ライブラリー (注 7) をもとに EST の収集を行い、約 10,000 の EST を獲得した。現在、それらを順次データベース化し公開する作業を進めている。

このプロジェクトの過程でマツノザイセンチュウからセルラーゼ (β -1,4-endoglucanase) の遺伝子が発見された (24)。セルラーゼは前述のように、他の植物寄生性線虫 (ネコブセンチュウ・シストセンチュウ) においてもクローニングされており、植物細胞壁の主成分であるセルロースを分解して、植物寄生に関与することが示唆されている (9)。ネコブセンチュウ・シストセンチュウのセルラーゼは Glycosyl Hydrolase Family (注 8) (GHF) 5 に分類されるものであったが、マツノザイセンチュウから発見されたセルラーゼは GHF45 に属するものであり、全く異なるタイプのセルラーゼであった。GHF45 のセルラーゼはこれまでいかなるセンチュウからもみつかっておらず、センチュウで最初の発見であった。さらに興味深いことに、系

図-3. Family45 セルラーゼ遺伝子の系統樹

統解析はマツノザイセンチュウのセルラーゼ遺伝子が糸状菌に最も近縁であること示した (図-3)。この結果は生物の進化系統樹に沿わないものであることから、マツノザイセンチュウのセルラーゼは糸状菌から遺伝子の水平転移 (注9) によって獲得されたものかもしれないと推測された (24)。このことはマツノザイセンチュウが菌食性をもち、糸状菌と深い関係にあることに関係するものかもしれない。一方でネコブセンチュウ・シストセンチュウのセルラーゼはバクテリアのものと類似性が高く、バクテリアからの水平転移によって獲得されたと考えられている (44, 62)。これらの結果はマツノザイセンチュウとネコブセンチュウ・シストセンチュウは異なる植物寄生能力の進化過程を経てきたこと、さらにその進化にはどちらの場合にも、遺伝子水平転移が関与してきた可能性を示唆していた。この仮説を検証するため、我々はマツノザイセンチュウのセルラーゼ遺伝子のより詳細な解析に取り組み、遺伝子水平転移の痕跡の探索を行っている。

セルラーゼ以外にもいくつか興味深い遺伝子が EST により得られてきている。例えば、線虫類で初めての β -1,3-グルカナーゼ (endo- β -1,3-glucanase) の遺伝子はマツノザイセンチュウの EST から発見された (Kikuchi *et al.* 投稿中)。この酵素は糸状菌細胞壁を構成する主要な多糖類である β -1,3-グルカン分解するもので、マツノザイセンチュウの菌食性に関与しているものと思われる。このような遺伝子の発見は EST によって比較的容易に行うことができたが、従来の分子生物学的手法、生化学的手法を用いて発見・同定することは、かなり困難で時間とコストのかかる作業となったであろうと思われる。今後、セルラーゼ以外の植物寄生性に関与すると考えられる遺伝子が EST を利用して発見され、マツノザイセンチュウの植物寄生メカニズムの解明に貢献することが期待される。また、それらの遺伝子をネコブセンチュウ・シストセンチュウの植物寄生遺伝子と比較することで線虫の植物寄生の進化過程について何らかの考察ができれば面白い。

V. お わ り に

ここまで植物病原微生物のゲノム解析の現状を述べてきた。なるべく多くの情報を本稿に盛り込むよう努めたが、ゲノミクス研究の広がり急速で、植物病原微生物のゲノムプロジェクトをすべて網羅することはできていない。当分の間この広がり加速され、分子生物学的または進化学的研究対象となっている生物の多くは少なくともドラフトレベルでのゲノムが入手できるようになる日はそう遠くないように思われる。もう少し身近なところでいうと、自動シーケンサーがラボ単位にまで普及し、シーケンス決定が容易にできるようになってきていることから、個々のラボから発信される EST などの DNA 配列データも急速に増加し続けるだろう。そうすると、研究の目標は興味ある遺伝子を単離するという段階から、それぞれの遺伝子の機能の解明やいくつもの遺伝子の関与する生体内での分子

ネットワークの解明を目的とするという局面に移行していくことになる。植物病原微生物においてもこれらの目的のため、cDNA の収集やマイクロアレイ技術を用いた転写産物の解析 (31, 40, 51) (トランスクリプトミクス)、2 次元電気泳動や抗体を用いたタンパク質の網羅的解析 (26, 35) (プロテオミクス)、網羅的な遺伝子破壊株の作成 (15, 50) や RNAi による遺伝子機能解析 (20, 55) 等への取り組みがすでに始まっている。今後はそのようなゲノム機能解析技術を組み合わせることにより、病原微生物自体の理解、あるいは植物-病原微生物間の相互作用の理解が進み、ゲノム創農薬や抵抗性育種、病害診断システムの構築等の応用的な利用へと近づくことが期待される。我々が行っているマツノザイセンチュウ EST プロジェクトで得られた EST データは近々、公開予定である。最後に、このデータの利用をお願いしたい。この配列データを用いることで、容易に目的の遺伝子を PCR 増幅やクローニングすることが可能である。これは分子寄生学的な解析のみならず、進化学的な解析や分子生態学的な解析にも役立つと思う。今後 EST データがそれぞれの研究で活用され、マツノザイセンチュウ研究が益々盛んになり、松枯れのメカニズム解明に近づくことを願う。

引用文献

- (1) Abu, S. M., Li, G., and Asiegbu, F. O. (2004) Identification of *Heterobasidion annosum* (S-type) genes expressed during initial stages of conidiospore germination and under varying culture conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 233 : 205-213.
- (2) Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287 : 2185-2195.
- (3) Arabidopsis-Genome-Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408 : 796-815.
- (4) Arnold, D. L., Pitman, A., and Jackson, R. W. (2003) Pathogenicity and other genomic islands in plant pathogenic bacteria. *Mol. Plant Pathol.* 4 : 407-420.
- (5) Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., *et al.* (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392 : 71-75.
- (6) Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., *et al.* (2003) The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 : 10181-10186.
- (7) Chambergo, F. S., Bonaccorsi, E. D., Ferreira, A. J., Ramos, A. S., Ferreira Junior, J. R., Abrahao-Neto, J., Farah, J. P., and El-Dorry, H. (2002) Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J. Biol. Chem.* 277 : 13983-13988.
- (8) da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M., *et al.* (2002)

- Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417 : 459-463.
- (9) de Boer, J. M., Yan, Y., Wang, X., Smant, G., Hussey, R. S., Davis, E. L., and Baum, T. J. (1999) Developmental expression of secretory beta-1,4-endoglucanases in the subventral esophageal glands of *Heterodera glycines*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12 : 663-669.
 - (10) Dorris, M., De Ley, P., and Blaxter, M. L. (1999) Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitol. Today* 15 : 188-193.
 - (11) Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., *et al.* (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269 : 496-512.
 - (12) Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. J., Smirnov, S., Purcell, S., *et al.* (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422 : 859-868.
 - (13) Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., *et al.* (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296 : 92-100.
 - (14) Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Qurollo, B., Goldman, B. S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., *et al.* (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294 : 2323-2328.
 - (15) Hamer, L., Adachi, K., Montenegro-Chamorro, M. V., Tanzer, M. M., Mahanty, S. K., Lo, C., Tarpey, R. W., Skalchunes, A. R., Heiniger, R. W., Frank, S. A., *et al.* (2001) Gene discovery and gene function assignment in filamentous fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 : 5110-5115.
 - (16) Imanishi, T., Itoh, T., Suzuki, Y., O'Donovan, C., Fukuchi, S., Koyanagi, K. O., Barrero, R. A., Tamura, T., Yamaguchi-Kabata, Y., Tanino, M., *et al.* (2004) Integrative annotation of 21,037 human genes validated by full-length cDNA clones. *PLoS Biol.* 2 : e162.
 - (17) International-Human-Genome-Sequencing-Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 : 931-945.
 - (18) Jaubert, S., Laffaire, J. B., Abad, P., and Rosso, M. N. (2002) A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *FEBS Lett.* 522 : 109-112.
 - (19) Johansson, T., Le Quere, A., Ahren, D., Soderstrom, B., Erlandsson, R., Lundeberg, J., Uhlen, M., and Tunlid, A. (2004) Transcriptional responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17 : 202-215.
 - (20) Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S. (2003) RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16 : 769-776.
 - (21) 金子貴一 (2004) 根粒菌ゲノム構造の特徴. (分子レベルから見た植物の耐病性. 島本 功・渡辺雄一郎・柘植尚志編, 秀潤社, 東京). 42-48.
 - (22) Kawai, J., Shinagawa, A., Shibata, K., Yoshino, M., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Hara, A., Fukunishi, Y., Konno, H., *et al.* (2001) Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature* 409 : 685-690.
 - (23) Kikuchi, S., Satoh, K., Nagata, T., Kawagashira, N., Doi, K., Kishimoto, N., Yazaki, J., Ishikawa, M., Yamada, H., Ooka, H., *et al.* (2003) Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. *Science* 301 : 376-379.
 - (24) Kikuchi, T., Jones, J. T., Aikawa, T., Kosaka, H., and Ogura, N. (2004) A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *FEBS Lett.* 572 : 201-205.
 - (25) Kim, S., Ahn, I. P., and Lee, Y. H. (2001) Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14 : 1340-1346.
 - (26) Kim, S. T., Yu, S., Kim, S. G., Kim, H. J., Kang, S. Y., Hwang du, H., Jang, Y. S., and Kang, K. Y. (2004) Proteome analysis of rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) proteome during appressorium formation. *Proteomics* 4 : 3579-3587.
 - (27) 小原雄治・榑 佳之 (2001) ゲノムサイエンス: 世界と日本の動向, 今後の展開. 蛋白質 核酸 酵素 46 : 2225-2231.
 - (28) Koltai, H. and Volpin, H. (2003) Agricultural genomics: An approach to plant protection. *Eur. J. Plant Pathol.* 109 : 101-108.
 - (29) 久保康之・辻 元人 (2004) 糸状菌の病原性遺伝子. (分子レベルから見た植物の耐病性. 島本 功・渡辺雄一郎・柘植尚志編, 秀潤社, 東京). 64-73.
 - (30) Lambert, K. N., Allen, K. D., and Sussex, I. M. (1999) Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12 : 328-336.
 - (31) McCarter, J. P., Mitreva, M. D., Martin, J., Dante, M., Wylie, T., Rao, U., Pape, D., Bowers, Y., Theising, B., Murphy, C. V., *et al.* (2003) Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. *Genome Biol.* 4.
 - (32) Mewes, H. W., Albermann, K., Bahr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S. G., *et al.* (1997) Overview of the yeast genome. *Nature* 387 : 7-65.
 - (33) 村上康文 (2000) ゲノム解析を可能にした技術. 現代化学 347 : 21-28.
 - (34) 村上康文 (2000) ゲノム解析研究の現状と展望. 現代化学 346 : 58-64.
 - (35) Navas, A., Lopez, J. A., Esparrago, G., Camafeita, E., and Albar, J. P. (2002) Protein variability in *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) revealed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 1 : 421-427.
 - (36) Nugent, K. G., Choffe, K., and Saville, B. J. (2004) Gene expression during *Ustilago maydis* diploid filamentous growth: EST library creation and analyses. *Fungal Genet. Biol.* 41 : 349-360.
 - (37) Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., *et al.* (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat. Genet.* 36 : 27-29.
 - (38) Parkinson, J., Mitreva, M., Hall, N., Blaxter, M., and McCarter, J. P. (2003) 400000 nematode ESTs on the Net. *Trends Parasitol.* 19 : 283-286.
 - (39) Popeijus, H., Overmars, H., Jones, J., Blok, V., Goverse, A., Helder, J., Schots, A., Bakker, J., and Smant, G. (2000) Degradation of plant cell walls by a nematode. *Nature* 406 : 36-37.
 - (40) Puthoff, D. P., Nettleton, D., Rodermel, S. R., and Baum, T. J. (2003) *Arabidopsis* gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *Plant J.* 33 : 911-921.
 - (41) Qin, L., Kudla, U., Roze, E. H., Goverse, A., Popeijus, H., Nieuwland, J., Overmars, H., Jones, J. T., Schots, A., Smant, G., *et al.* (2004) Plant degradation: a nematode

- expansin acting on plants. *Nature* 427 : 30.
- (42) Sacadura, N. T. and Saville, B. J. (2003) Gene expression and EST analyses of *Ustilago maydis* germinating teliospores. *Fungal Genet. Biol.* 40 : 47-64.
- (43) Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Manganot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L., *et al.* (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415 : 497-502.
- (44) Scholl, E. H., Thorne, J. L., McCarter, J. P., and Bird, D. M. (2003) Horizontally transferred genes in plant-parasitic nematodes: a high-throughput genomic approach. *Genome Biol.* 4 : R39.
- (45) Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., *et al.* (2002) Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* 296 : 141-145.
- (46) Simpson, A. J., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., *et al.* (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* consortium of the organization for nucleotide sequencing and analysis. *Nature* 406 : 151-157.
- (47) Smant, G., Stokkermans, J. P., Yan, Y., de Boer, J. M., Baum, T. J., Wang, X., Hussey, R. S., Gommers, F. J., Henrissat, B., Davis, E. L., *et al.* (1998) Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 4906-4911.
- (48) Soanes, D. M., Skinner, W., Keon, J., Hargreaves, J., and Talbot, N. J. (2002) Genomics of phytopathogenic fungi and the development of bioinformatic resources. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15 : 421-427.
- (49) Stein, L. D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M. R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., *et al.* (2003) The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS Biol.* 1 : E45.
- (50) Sweigard, J. A. and Ebbole, D. J. (2001) Functional analysis of pathogenicity genes in a genomics world. *Curr. Opin. Microbiol.* 4 : 387-392.
- (51) Takano, Y., Choi, W., and Dean, R. A. (2002) Presented at the Plant, Animal & Microbe Genomes X, San Diego, CA, 12-16 January 2002.
- (52) The-Caenorhabditis-elegans-Sequencing-Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282 : 2012-2018.
- (53) Thomas, S. W., Rasmussen, S. W., Glaring, M. A., Rouster, J. A., Christiansen, S. K., and Oliver, R. P. (2001) Gene identification in the obligate fungal pathogen *Blumeria graminis* by expressed sequence tag analysis. *Fungal Genet. Biol.* 33 : 195-211.
- (54) Trail, F., Xu, J. R., San Miguel, P., Halgren, R. G., and Kistler, H. C. (2003) Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genet. Biol.* 38 : 187-197.
- (55) Urwin, P. E., Lilley, C. J., and Atkinson, H. J. (2002) Ingestion of double-stranded RNA by parasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15 : 747-752.
- (56) Van Sluys, M. A., de Oliveira, M. C., Monteiro-Vitorello, C. B., Miyaki, C. Y., Furlan, L. R., Camargo, L. E., da Silva, A. C., Moon, D. H., Takita, M. A., Lemos, E. G., *et al.* (2003) Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *J. Bacteriol.* 185 : 1018-1026.
- (57) Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., *et al.* (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304 : 66-74.
- (58) Waugh, M., Hraber, P., Weller, J., Wu, Y., Chen, G., Inman, J., Kiphart, D., and Sobral, B. (2000) The phytophthora genome initiative database: informatics and analysis for distributed pathogenomic research. *Nucleic Acids Res.* 28 : 87-90.
- (59) Wipf, D., Benjdia, M., Rikirsch, E., Zimmermann, S., Tegeder, M., and Frommer, W. B. (2003) An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants, complementation of a yeast his4 mutant, and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. *Genome* 46 : 177-181.
- (60) Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F., Jr., *et al.* (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294 : 2317-2323.
- (61) Wylie, T., Martin, J. C., Dante, M., Mitreva, M. D., Clifton, S. W., Chinwalla, A., Waterston, R. H., Wilson, R. K., and McCarter, J. P. (2004) Nematode.net: a tool for navigating sequences from parasitic and free-living nematodes. *Nucleic Acids Res.* 32 Database issue : D423-426.
- (62) Yan, Y., Smant, G., Stokkermans, J., Qin, L., Helder, J., Baum, T., Schots, A., and Davis, E. (1998) Genomic organization of four beta-1,4-endoglucanase genes in plant-parasitic cyst nematodes and its evolutionary implications. *Gene* 220 : 61-70.
- (63) Yoder, O. C. and Turgeon, B. G. (2001) Fungal genomics and pathogenicity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 : 315-321.
- (64) Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., *et al.* (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296 : 79-92.

注 記

- (注 1) ウイルスを除く。
- (注 2) 酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome)。酵母染色体の分離と増殖に必要な構造を持つ DNA を利用し、2 Mb までの巨大な DNA 断片をクローニングできる。
- (注 3) PCR=polymerase chain reaction。DNA の一部を、試験管内でポリメラーゼを利用して人工的に大量増幅する方法。
- (注 4) ヒトゲノムの場合、タンパク質をコードする領域は 1~5% にすぎないといわれる。
- (注 5) 配列が同定された遺伝子に系統的なコード番号あるいは名称をつけること。特に、機能アノテーションとは、全塩基配列情報の解読に加え、それらが既知の遺伝子なのか、新規の遺伝子なのか、既知遺伝子と類似性を有するのか、どのような機能を持つ遺伝子なのかなどの情報の注釈付けをしたもの。
- (注 6) 18 s リボソーム RNA 遺伝子部位を使用した系統解析による分類群 (5, 10)。
- (注 7) ここで数種類のライブラリーを作成しているのは、発育ステージの異なる材料を使用することで、発現している遺伝子の配列をより多く得られることを期待してのことである。
- (注 8) Glycosyl Hydrolase Family の分類は Cazy (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/acc.html>) から参照できる。
- (注 9) 遺伝子が親子を経由せず、生物の種の壁を越えて伝えられること。