

イネ（日本晴）ゲノム P1 ライブラリーの構築

田中國介・牧野英志・増村威宏

Construction of the rice genomic P1 library

KUNISUKE TANAKA, HIDESHI MAKINO, and TAKEHIRO MASUMURA

要旨：プロトプラスト化せず、イネ若葉より 1 Mb 程度の高分子量核 DNA を調製する手法を確立した。制限酵素 *Mbo* I により部分消化した後、70-95 kb のイネゲノム DNA 断片を得た。この DNA を材料として、P1 クローニングシステムを用いてイネゲノムライブラリーを構築した。任意に選択したクローンよりプラスミドを回収し、制限酵素 *Not* I で切断し電気泳動した結果、このライブラリーは平均 85 kb のインサート DNA を持つプラスミドによって構成されていることが分かった。

緒 言

イネ種子貯蔵タンパク質やスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) は、数種の遺伝子から構成されたファミリーをつくっていることが明らかになっている。著者らは既に、これらのタンパク質に対応する数種の cDNA 及びゲノム DNA のクローニングと構造解析を終えている。次に、これらの単離、解析した遺伝子の染色体上での分布、即ち遺伝子が数個連続して存在しているクラスター構造を取っているか、或いはゲノム中に散在しているかを明らかにすることは、これらの遺伝子の発現調節機構を解明する上で極めて重要である。ゲノムの広い範囲に存在している遺伝子、および、それらの発現制御に関与する領域を明らかにすることにより、初めて遺伝子間や染色体レベルでの遺伝子の発現調節機構を理解することが可能であると考えられる。

これらの研究を効率的に行うためには、可能な限り長鎖長の連続した DNA 断片をクローニングしライブラリーを構築することが必要である。従来、このような目的には、30-42 kb の DNA 断片をクロ

ーニングできるコスミドベクターが用いられてきた。さらに長鎖の DNA 断片をクローニングする目的では YAC ベクターが開発された。YAC ベクターは数百 kb の DNA 断片を一度にクローニングすることが可能であり、イネにおいても YAC ライブラリーの構築が試みられている。しかし、DNA 分子内で組替えが起こりやすいなど、ライブラリーの構築、維持が困難な点もあった。また目的とするクローン内部の詳細な解析を行う上で、その挿入断片が大きすぎるために、ゲノムの塩基配列レベルでの解析には必ずしも適しているとはいえなかった。

最近開発された P1 クローニングシステム¹⁾²⁾は、コスミドと YAC の中間を埋める能力を持つベクターで、70-95 kb の DNA 断片をクローニングすることが可能でインサートの解析を比較的容易に行うことができる (Fig. 1)。

長鎖の DNA 断片を持つライブラリーを構築するためには組織からできるだけ完全な状態で DNA を調製する必要がある。植物組織を材料とする場合、これまでの手法では細胞壁を除いてプロトプラストを調製する必要があった。また、調製した核 DNA は注意深く操作を行っても遠心分離や溶液中でのピ

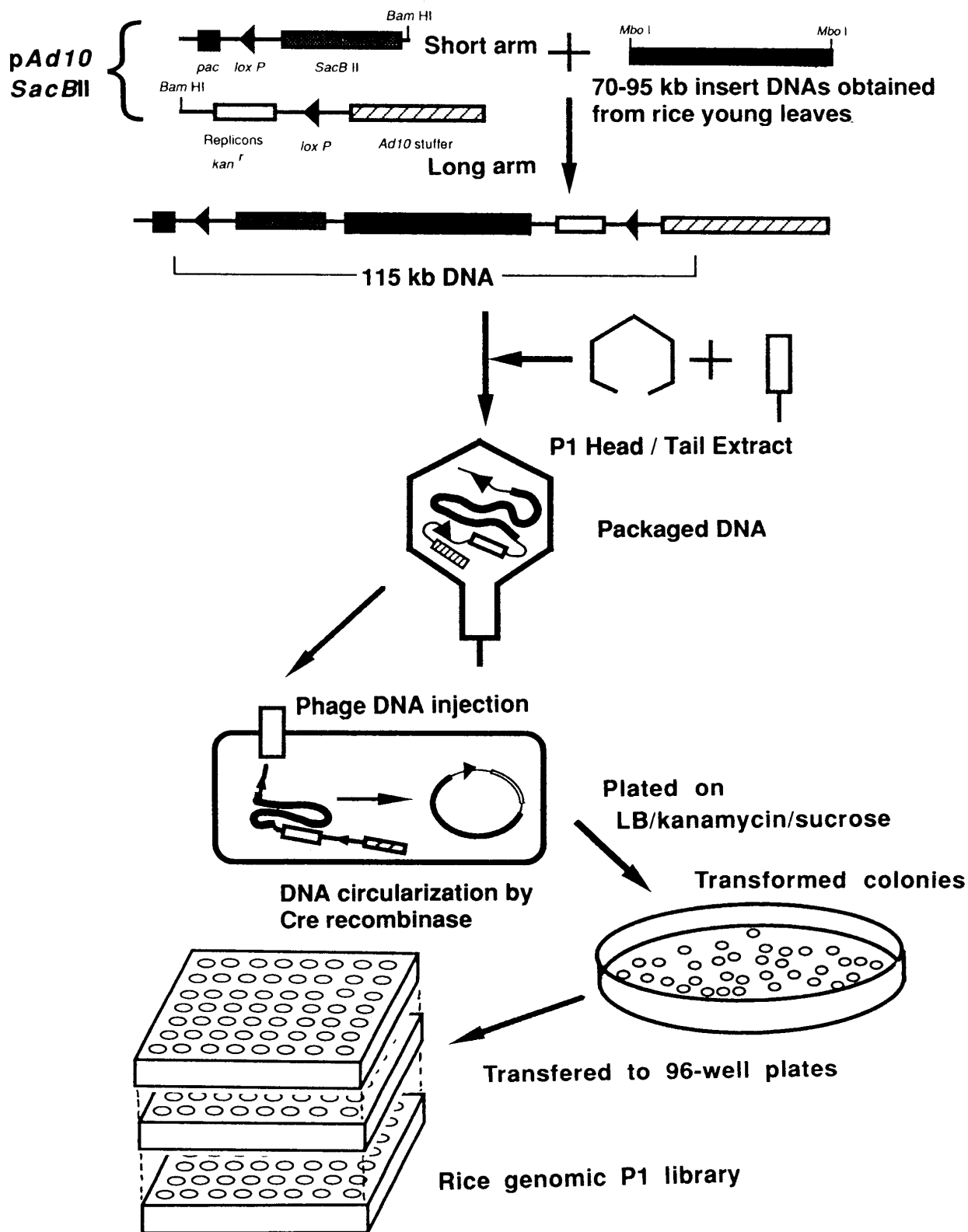


Figure 1.
Outline of construction for the rice genomic P1 library.

ペット操作による物理的な力によりDNAが切断されてしまうために数百 kb, 数 Mb の巨大DNA分子を調製することは困難であった。そこで、本研究ではイネ若葉から直接、核画分を調製し、低融点アガロースに包埋してDNAに物理的な力がかかりにくいようにした。さらに EDTA, sarkosyl, Proteinase K を含む溶液中でヌクレアーゼ活性を抑えつつ、核膜と核タンパク質を破壊して、1 Mb 程度の長鎖の核 DNA を調製した。このDNAを制限酵素 *Mbo* I により、70-95 kb の大きさに部分消化を行った後、ライブラリーを構築した。本稿ではその手法の詳細について述べる。

本研究で構築した P1 ライブラリーは、イネにおいて最初の成果であり、クローン解析における取扱いが YAC ライブラリーと比較してはるかに簡単であるという点で、既に得られている各種有用遺伝子のゲノム上での分布状態などを直接、塩基配列レベルで詳細にかつ効率的に解析するために有用であると考えられる。

材料及び方法

1. 材料

イネ若葉：*Oryza sativa*. L. (cv Nipponbare) を京都府立大学実験農場で栽培し、播種後約 15 日目の若葉を用いた。

2. 試薬

P1 cloning vector, packaging system は Dupont-NEN から、制限酵素は宝酒造から、agarose は FMC BioProducts から、alkaline phosphatase は東洋紡から、Proteinase K は和光純薬工業から、 β -agarase I, T4 DNA ligase, λ ladder PFG marker は New England Biolabs から、ナイロンメッシュは共進理工から、セルロースフィルター VSWP 02500 は Millipore から、それぞれ購入した。

3. 器具

パルスフィールドゲル電気泳動装置は BIO-RAD 製の CHEF-DR II を使用した。

4. 手法

1) イネ若葉からの高分子量核 DNA の調製
① 約 20 g のイネ若葉をハサミで 5 cm の長さに切り刻み、 -20°C で予冷しておいた直径 15 cm 位の乳鉢に適量の液体窒素と共に入れ乳棒ですりつぶして粉末にする。

(以下の作業は氷上で行いすべての器具や試薬

も 4°C で予冷しておく。)

- ② すりつぶしたイネに nuclei isolation buffer (10mM Tris-HCl pH9.5, 20mM EDTA pH8.0, 80mM KCl, 0.5M sucrose, 4mM spermidine, 1mM spermine, 0.1% 2-mercaptoethanol) 120 ml を加え、よく攪拌する。
 - ③ 四重にしたガーゼで②で得た試料をろ過する。搾りかすを元のビーカーに戻し nuclei isolation buffer 70 ml を加えて再懸濁し、ろ過して最初のろ液と合わせる。
 - ④ ろ液を 300 ml ガラスビーカーの上部にかぶせた孔径 250 μm の一重のナイロンメッシュでろ過する。
 - ⑤ ろ液を続けて 90, 50, 20 μm のナイロンメッシュでろ過する。
 - ⑥ ろ液を 50 ml コニカルチューブに分注し 2,000 xg 10 min 遠心する。並行して 1.5% low-melting point agarose (10mM Tris-HCl pH9.5, 10mM EDTA, 1.5% agarose) を溶かし 45°C に保持しておく。
 - ⑦ チューブを逆さにして上清を除き、沈殿に全量で 1.2 ml になるように nuclei isolation buffer を加え、先切りチップを用いてよく懸濁する。
 - ⑧ ⑦で得られた懸濁液を 40°C で 1~2 min 加温し、等量の agarose と混ぜる。
 - ⑨ gel plug の型を蒸留水でよく拭き組み立て⑧で得られた試料を注入する。
 - ⑩ ラップで包み氷上で 30 min 置いて固める。
 - ⑪ 50 ml コニカルチューブに lysis buffer (1% sarkosyl, 0.2M EDTA, 0.1mg/ml Proteinase K) 30 ml を取り gel plug をミクロスパチュラでチューブに移す。
 - ⑫ 50°C の incubator で振とうしながら 48 hr 消化する。24 hr で一度 lysis buffer を交換する。
 - ⑬ lysis buffer を除き、gel plug を TE buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0) 30ml で 5 回洗い TE buffer 30ml に 0.1M PMSF 600 μl 加え 50°C 2hr 静置し、Proteinase K を失活させる。
 - ⑭ TE buffer 30 ml で 5 回洗う。
- 2) 高分子量 DNA の部分消化と分画
 - ① TE buffer を除き、30 ml の蒸留水で 3 回洗う。gel の重量を計り、比重を 1 として体積とする。
 - ② gel 体積の 2 倍量の 1.5 x *Mbo* I reaction buffer (15mM Tris-HCl pH8.0, 225mM KCl, 15 $\mu\text{g/ml}$ BSA) と 0, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5,

2.0 units/ml の濃度になるように *Mbo* I を加え、4°C で 4 hr incubate する。

- ③ 4 well の comb を用いてパルスフィールドゲル電気泳動 (CHEF) 用の 1% agarose gel を 0.5 x TBE buffer (45mM Tris-borate, 1mM EDTA pH8.3) で作製する。予備実験の際は SeaKem LE agarose を用いて一枚につき 100 ml 使って作製し、本実験の際は SeaPlaque GTG agarose を用いて一枚につき 220 ml 使って作製する。すきまふさぎ用に、1% low-melting point agarose gel を 0.5x TBE buffer で調製する。
- ④ 1 M $MgCl_2$ を終濃度 7 mM になるように加え、軽く混ぜ、氷上で 15 min、次に 37°C で 10 min incubate する。すきまふさぎ用 gel を溶かし

て 45°C に置いておく。

- ⑤ gel plug を 0.5x TBE buffer で洗い、agarose gel の well に挿入する。ピペットで well 内の余分の buffer を除き、すき間をすき間ふさぎ用 gel で埋める。分子量 marker として λ ladder PFG marker を使う。
- ⑥ CHEF で泳動する。泳動パラメーター：パルスタイム Initial time 3sec, Final time 30sec, 電圧 170 V, 泳動時間 15 hr, 温度 14°C
- ⑦ 泳動終了後、予備実験の場合は gel 全体を EtBr 染色し、ゲノム DNA の消化の程度を確認する (Fig. 2)。最適の酵素濃度を決定して本実験をスケールアップして同様にして行なう。本実験の場合は、gel の marker 部分とその隣の plug のレーンを 3 mm くらい一緒に切り出し、

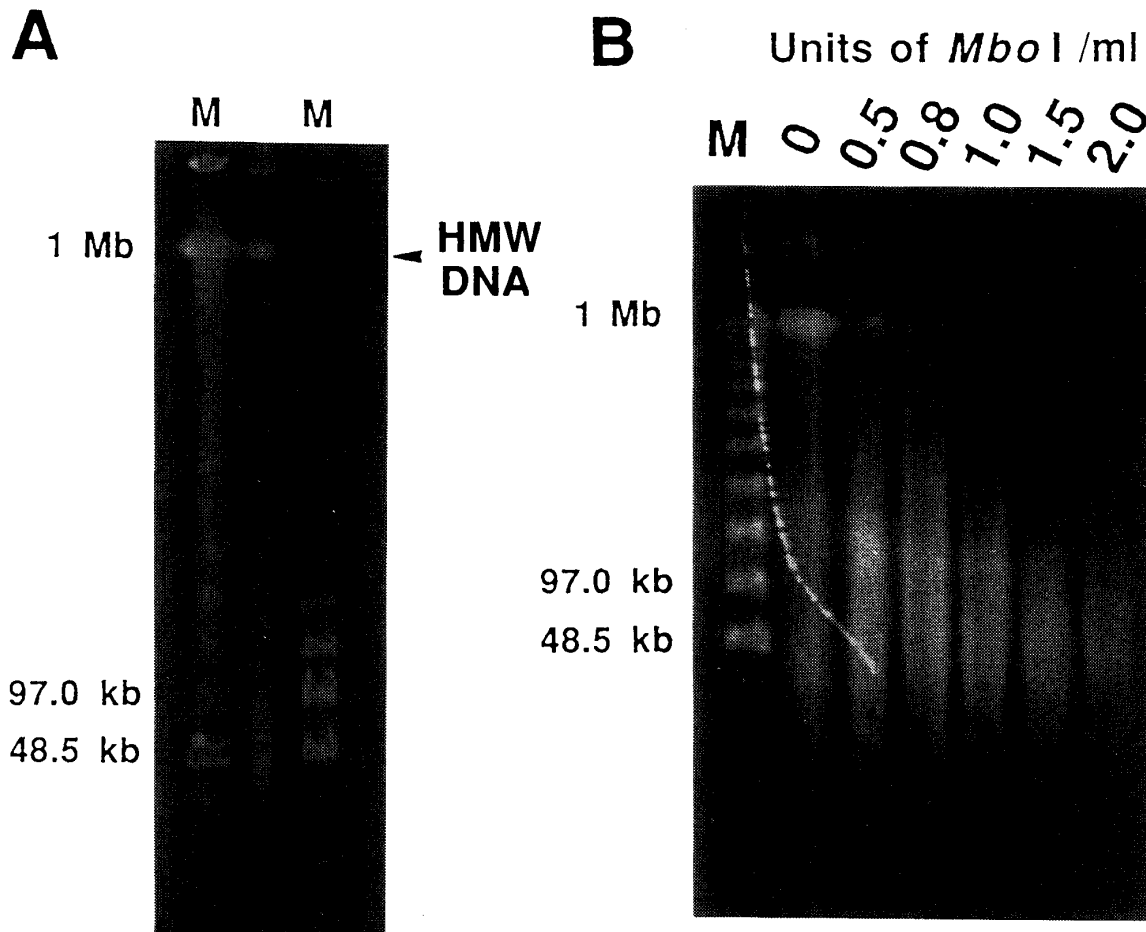


Figure 2.

CHEF of rice genomic DNA.

A. Isolated HMW DNA from rice young leaves.

HMW DNA indicates rice genomic DNA obtained by liquid nitrogen method.

Lane M contains DNA size markers.

B. Partially digested HMW DNA.

HMW DNA was partially digested with *Mbo* I in several concentration.

Lane M contains DNA size markers.

EtBr 染色し, これを頼りに 70-95 kb の部分を切り出す。

- ⑧ 切り出した gel を 2 mm 角に刻み, 30 ml の β -agarase I buffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 0.1M NaCl) で一度洗い, buffer を交換して gel を平衡化する。
- ⑨ スライスした gel に付着している余分の buffer を取り去り, 70°C の湯浴に 15 min 置き, gel を溶かす。gel が溶けきっていない場合は, 10 min 位延長して完全に gel を溶かす。40°C の湯浴に移し, 緩やかに混ぜる。gel 1 g 当り 10 units の β -agarase I を加え, 緩やかに混ぜる。30 min 後にもう一度緩やかに混ぜ, 2 hr incubate して gel を消化させる。
- ⑩ 氷上に 10 min 置き, 上清を 2.2 ml 遠心チューブに移し, 14,000 xg 5 min 遠心する。
- ⑪ 45°C にしたホットプレートにサララップを敷き, ⑩ で得た上清を載せる。gel 1 g 当たり 10 units の β -agarase I を加え, 溶解した gel を消化する。水分が蒸発して全体の液量が 1/5 になるまで濃縮する。
- ⑫ シャーレに 50 ml の STE buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA, 0.1M NaCl) を入れ,

セルロースフィルター VSWP 02500 を浮かべ (光沢のあるほうが上), その上に静かにピペットで, 濃縮した DNA 溶液を載せ, 1 hr 静置して透析し消化したアガロースを除く。もし, この段階でフィルターに gel が残っている場合には DNA 溶液を遠心して gel の小粒を除く。

- ⑬ フィルターから DNA 溶液を回収し⑩と⑪のプロセスを更に二回繰り返す。液をホットプレート上に戻す際にフィルターに残った DNA を少量の STE buffer で洗いとる。二度目以降は β -agarase I 消化はしない。透析した段階で DNA 濃度が最初の 50 倍の 100 μ g/ml 程度になるまで, 濃縮と透析を繰り返す。
- 3) Vector DNA の調製
 - ① P1 cloning vector pAd10sacB II (以下 vector) 10 μ g を, 500 μ l の系で 100 units の Sca I を用いて, overnight で完全消化する。
 - ② 等量の phenol/chloroform 混液 (phenol: chloroform: isoamylalcohol=25: 24: 1) を用いて phenol/chloroform 抽出を行う。vortex はせず, 1, 2 分穏やかに混合する。14,000 xg 5 min 遠心分離をして水層を回収し, phenol 層に 100 μ l の TE buffer を加えて, もう一度抽出する。
 - ③ 全水層の 1/10 量の 3 M sodium acetate pH 5.2 を加え, 2 倍量の 100% EtOH を加えて -20°C に 30 min 静置し, 遠心分離により DNA を回収後, 70% EtOH でリンスして, 45°C ヒートブロック上で余分の EtOH を軽く飛ばす程度に乾燥させる。
 - ④ Vector を 50 μ l の 50 mM Tris-HCl pH8.0, 1mM MgCl₂ に溶かす, その一部を用い DNA 量を測定する。5 units の *E. coli* alkaline phosphatase を加えて, 60°C で 1 hr 以上 incubate する。phenol だけで二度抽出し, 酵素を失活させ, ②, ③ のように phenol/chloroform 抽出をもう一度行い, EtOH 沈殿をし, 軽く乾燥させ, 50 μ l の TE buffer に溶かす。
 - ⑤ BamH I 消化を 400 μ l の反応系で, vector DNA 1 μ g 当り 3 units の酵素を用い, 37°C で 15 min incubate して行う。phenol 抽出, EtOH 沈殿し, 軽く乾燥後, vector を 50mM Tris-HCl pH8.0 50 μ l に溶かす。
 - ⑥ DNA 1 μ g 当り 0.005 units の Calf intestine alkaline phosphatase を加え, 37°C 30min incubate する。続いて phenol 抽出, EtOH 沈殿を行う。ethanol 沈殿の際, 1/4 量の 10M am-

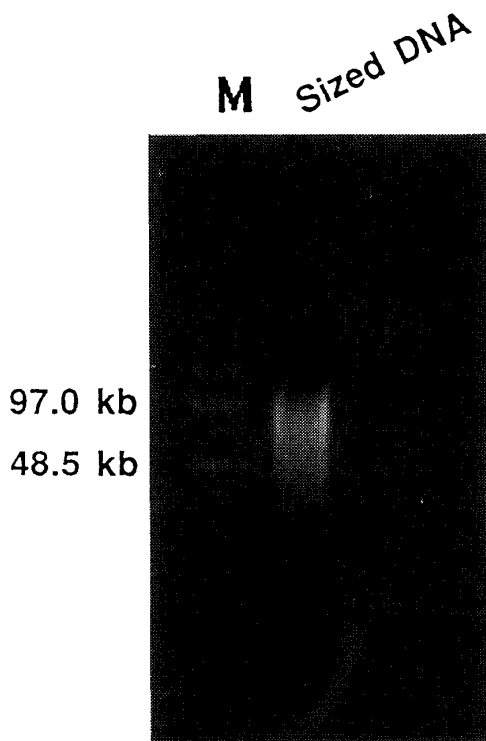


Figure 3.
CHEF of 70-95kb sized genomic DNA.
DNA was recovered from low-melting point agarose gel, concentrated and dialyzed.
Lane M contains DNA size markers.

monium acetate と 2.5 倍量の 100% EtOH を用いる。

- ⑦ DNA 量を測定し, 300 ng/ μ l の濃度に TE buffer で調整する。

4) Vector DNA と genomic DNA のライゲーション

- ① 1.5 ml 遠心チューブに前項で調製した vector DNA 1.3 μ l (400 ng), genomic DNA 600 ng, 蒸留水を 8 μ l まで加えて, チップの先で緩やかに混ぜる。
- ② 65°C 5 min incubate し, 氷上で急冷する。5 x T4 DNA ligase buffer (0.5M Tris-HCl pH7.5, 0.1M MgCl₂, 0.1M DTT, 0.5mg/ml BSA) 2 μ l を加え, チップの先で緩やかに混ぜる。
- ③ 同じ遠心チューブのキャップに蒸留水 8 μ l, 5 x T4 DNA ligase buffer 2 μ l, T4 DNA ligase 1.5units を加えよく混ぜる。そして, フタをした後, 軽く遠心してチューブに移し, 更によく混ぜる。
- ④ 16°C で 4 hr 反応させる。
- ⑤ ligation 液を 70°C 10 min incubate し, 酵素を失活させる。

5) Host 菌の調製

- ① 200 ml 三角フラスコ中の 30 ml の LB 培地 (0.5% NaCl, 1% Trypton, 0.5% yeast extract) に host 菌 NS 3529 を一白金耳分植菌し 37°C overnight 振とう培養する。
- ② 50 ml コニカルチューブに移し, 2,000 xg 5 min 4°C で遠心して集菌する。上清を除き, 10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgSO₄ 15ml を加えて, 軽く懸濁し 4°C で保存する。この状態で数か月は保存可能である。

6) Ligated DNA のパッケージング

- ① 1.5 ml 遠心チューブに Pacase buffer (100mM Tris-HCl pH8.0, 500mM NaCl, 100mM MgCl₂) 1.8 μ l, dNTP mix (1mM each of dNTP) 1.8 μ l, 25mM DTT 1.2 μ l, 50mM ATP 1.2 μ l を取り, ligated DNA 4 μ l と蒸留水 6.8 μ l を加え, チップの先でよく混ぜる。最後に Pacase extract 1.2 μ l を加え, チップの先でゆっくりとよく混ぜる。
- ② 30°C 15 min incubate する。
- ③ Head/Tail buffer (6mM Tris-HCl pH7.5, 15mM ATP, 16mM MgCl₂, 60mM spermi-

dine, 30mM 2-mercaptoethanol, 60mM putrescine) 3 μ l と 50mM ATP 1 μ l を加え, 先切りチップを使って, ゆっくりと中身をすべて Head/Tail extract のチューブに移す。中身が均一になるまでゆっくりと混ぜる。

- ④ 30°C 5 min incubate し, 10,000 xg 10 sec 遠心して泡を除き, 再び 30°C 15 min incubate する。
- ⑤ 10 μ g/ml の DNase I を加えた TMG buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 10mM MgCl₂, 0.1% gelatin) 150 μ l を加え, 軽く vortex し 37°C 15 min incubate する。
- ⑥ chloroform 10 μ l を加えて軽く vortex し, 10,000 xg 1 min 遠心して上清を新しい遠心チューブに移す。

7) Host 菌の形質転換とプレーティング

- ① 前培養した host 菌をよく懸濁して, 200 μ l を 200 ml 三角フラスコ中の LB 培地 20 ml に加えて, ロータリーシェーカーを用い, 37°C 250 rpm で OD₅₉₀=0.5 になるまで (約 2 hr) 振とう培養する。50 ml コニカルチューブに移し, 2,000 xg 5 min 4°C で遠心して集菌する。上清を除き, LB/5 mM CaCl₂ 2 ml を加えて, よく懸濁する。使用するまで, 氷上に置く。数時間内に使用する。この量で 1 パッケージング反応分撒くことができる。
- ② 1 パッケージング反応分の 1/10 量の phage 液を予め金属キャップをして滅菌したガラスの試験管に取り, キャップをずらして 37°C 10 min 静置し, 含んでいる chloroform を蒸発させる。本数が多ければキャップをはずしてサララップをかぶせておいてもよい。
- ③ 前培養した host 菌を試験管 1 本につき, 200 μ l 加え, phage と混ぜ合わせる。
- ④ 振とうせずに 37°C 10 min incubate する。
- ⑤ あらかじめ 37°C にしておいた LB 培地を 1 ml 加えて, ロータリーシェーカーを用い, 37°C 45 min 250 rpm で incubate する。
- ⑥ 1.5 ml の遠心チューブに移し, 3,500 xg 2 min 遠心して上清を捨て, 菌を集める。
- ⑦ LB 培地 50 μ l に懸濁して, 遠心チューブ 5 本分を 1 枚の LB, 25 μ g/ml kanamycin, 5% sucrose を含む 1.5% 寒天培地の 13.5cm plate に spreader を用いて均一にまき, 数分間シャーレの蓋を半分開き, 余分な水分を蒸発させる。plate を作る際, kanamycin は LB 寒天培地が 55°C に冷めてから加え, 5% sucrose はあらか

じめ 55°C にしておいた 50% stock から最終寒天培地容量の 1/10 量加える。

- ⑧ plate を逆さにして 37°C で overnight 培養する。目安として、plate 1 枚に約 2,000 個の colony が生成する。
- 8) コロニーの回収
- ① 生じた colony を一つ一つ爪楊枝で pick up して、100 μ l の 25 μ g/ml kanamycin を含む LB 培地を加えた 96 穴マイクロテストプレート (Falcon 3072) の各穴に懸濁する。
- ② 37°C で緩やかに (約 100 rpm) ロータリーシェーカーで振とうしながら overnight 培養する。
- ③ 各穴につき 60% glycerol 50 μ l を加えよく攪拌してから、-80°C で保存する。

結果および考察

植物から高分子量 DNA を調製するために、従来までのように試料を一旦プロトプラスト化せず、直接破碎して粗核画分を調製し³⁾、それを従来法と同様に低融点アガロースに包埋し、sarkosyl, EDTA 溶液中で Proteinase K 処理を行い核膜とヒストンなどの核タンパク質を消化し、核 DNA を調製した。細胞を最初に直接機械的に破碎して核画分を得ることに對して、それによって DNA が損傷を受けることが懸念されるが、この方法により、ライブラリーを構築するために十分である 1 Mb 程度の大きさの高分子量 DNA を得ることができた。このことから、操作が煩雑であるプロトプラスト化が不要であることがわかった。20 g のイネ若葉から 400 μ g 程度の核 DNA を調製し、制限酵素により部分消化して、1 μ g 程度のインサート用の DNA を得ることができた。しかし、ライブラリー構築の効率化には、さらに DNA の収率を改善しなくてはならない。

イネ核 DNA を部分消化する際には、ベクターのクローニング部位が、*Bam*H I であるので、同じ切断面を持つ四塩基認識の制限酵素である *Mbo* I を用いた。このような場合、*Sau*3A I を用いることが多いが、イネの場合 DNA が CG メチラーゼによるメチル化を受けている場合が多い。本研究においても、当初は *Sau*3A I を用いていたが、DNA がほとんど切断されなかった。そこで、CG メチラーゼによる影響を受けない *Mbo* I を用いたところよい結果を得た。すなわち、0.5 units/ml の酵素濃度で高分子量 DNA はほとんど断片化した。さらに 2 units/ml でほぼ 70 kb 以下に切断された。0.8 units/ml の酵素濃度で部分消化を行うことが適当

であると思われたが、その前後の 0.5 units/ml と 1 unit/ml を含めた 3 段階の酵素濃度で部分消化を行い、それぞれから 70-95 kb の DNA 断片を回収した。最適の酵素濃度のみで部分消化を行うのみではなくその前後の濃度を含めて行うことが、ライブラリーのポピュレーションを偏らせないために重要である。それは、すべての切断部位が確率的に均一に切断を受けるわけではないためである。それゆえに、切断されやすい部分の断片を得るためには低い酵素濃度で、切断を受けにくい部分の断片を得るためには高い酵素濃度で、それぞれで反応を行うことが必要だと考えられる。ポピュレーションの偏ったライブラリーからでは目的のクローンが得られない可能性がある。

CHEF と低融点アガロースゲルを用いて、DNA 断片の分画を行い、従来のショ糖密度勾配遠心法を用いる場合よりも、よい分離能を得ることができた。ゲルから一旦 DNA を回収した後にベクターとのライゲーションを行ったが、その際の効率がライブラリー構築の効率に最も重要である。現在までのところ、満足できる効率とはいえないが、分画した DNA が 70-95 kb の大きさであることは泳動して確認できた (Fig. 3)。インサート DNA の末端部分で *Mbo* I の切断面が結合可能な状態でそのまま保持されベクターと要求されるように連結しているかどうか、或いはライゲーション反応の際にゲノム DNA がセルフライゲーションを起こしていないかどうか、については不明である。以上の点がライブラリー構築の効率化に改善が必要とされる点である。

ライゲーション反応と P1 ファージへのパッケージングは、Pierce⁴⁾らの方法に従ったが、パッケージングは既成のキットを用いて、容易に行うことができた。本研究では、1.2 μ g の分画したゲノム DNA から約 2,000 個の独立したクローンを得ることができた。

一方、ランダムにピックアップしたクローンのインサート長を調べたところ、70-90 kb の長さを持ったインサートが確認できた。(Fig. 4)

約 2,000 個という数はイネゲノム全体をカバーするためには不十分であるが、イネで P1 ライブラリーを構築する手法が確立できたという意義は大きく、この手法を繰り返すことでゲノム全体をカバーするのに十分な数のクローン数 (約 20,000 個) を得ることは困難なことではない。

構築したライブラリー中では、インサートをプラスミドの状態で菌体内に保持している。そのため、目的のクローンをコロニーハイブリダイゼーションによって選択することができる。プラスミドは一般

参 考 文 献

- 1) Pierce J. C., Sauer B., Sternberg N. L. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 2056-2060
- 2) Sternberg N. L. (1992) Trends in Genetics, **8**, 11-16
- 3) 鈴木石根 (1990) 植物細胞工学, **5**, 664-668
- 4) Pierce J. C., Sternberg N. L. (1992) Methods Enzymol., **216**, 549-574

ABBREVIATIONS

BSA	bovine serum albumin
CHEF	contour clamped homogeneous electric field gel electrophoresis
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
HMW	high molecular weight
kb	kilo base pairs
Mb	mega base pairs
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
Sarkosyl	N-lauryl sarkosine
YAC	yeast artificial chromosome

Summary

We constructed a P1 library containing 70-95kb inserts of rice genomic DNA. The high molecular weight DNA was obtained from rice young leaves by a simple liquid nitrogen method. The high molecular weight DNAs were partially digested with restriction enzyme *Mbo* I, and ligated into P1 vector. This library consisted about 2,000 individual clones, and was expected to be useful for large scale genomic analyses.

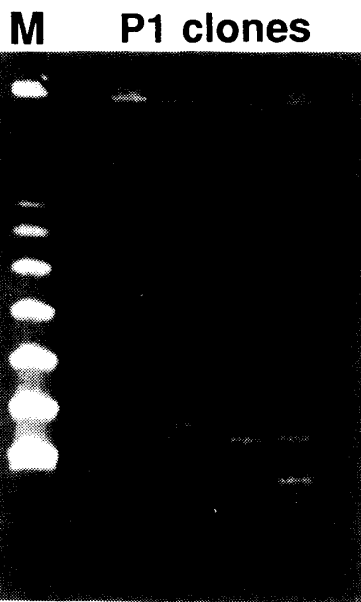


Figure 4.
CHEF of P1 clones digested by *Not* I .
P1 clones were picked up from library at random. Plasmids were isolated by alkaline-SDS method, then digested with *Not* I .
Lane M contains DNA size marker.

的なアルカリ-SDS法で調製することができ、YACライブラリーと比較して取り扱いがはるかに簡単である。

以上より、イネゲノムを100 kbレベルで連続的にクローニングすることが可能になった。このことからこのライブラリーを用いて、各種有用遺伝子のゲノム上での分布状態などを直接、塩基配列レベルで詳細にかつ効率的に解析することが期待できる。

謝 辞

本研究のため「日本晴」種子を快く使用させて下さった、京都府立大学付属農場 天野高久助教授に深く感謝いたします。また、本研究を行うにあたり、貴重な技術的助言をいただいた 三井業際植物バイオ研究所 劉耀光氏、光川典宏氏に深く感謝いたします。