

1. 研究課題名 : 植物のアルミニウムストレス耐性機構  
VI. 大麦アルミニウムストレス耐性関連遺伝子(群)  
単離に向けた [BAC ライブラリー作成]
2. 研究機関 : 農林水産省九州農業試験場育種工学研究室
3. 研究者 : 斎藤 彰
4. 研究協力者 : 宮崎 力 (科学技術振興事業団派遣研究員)
5. 研究期間 : 平成7年から平成11年
6. 要約

酸性、アルミニウムストレス応答遺伝子群をマップベースクローニングするためには、巨大ゲノムライブラリー作成が重要である。本研究では、300kb 以上の長い DNA をクローニングできる大腸菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome)を用いた巨大ゲノムライブラリー作成した。また、巨大 DNA 断片やその末端部位を効率的にクローニングできる9のクローニングサイトを導入した新規ベクター pCHR8 を開発した。効率的巨大ゲノミック DNA ライブラリー作製法を開発して、ベクターとゲノミック DNA との連結1反応で作成された Kasalath BAC ライブラリーは、クローニングされた巨大 DNA サイズが平均 106 kb の 6,5000 クローンを含んでいた。これはイネゲノムサイズの約 16 倍であり、イネゲノム全体を十分にカバーできる規模であり、葉緑体やミトコンドリア DNA は少なかった。イネの 3,7 染色体に対応する BAC クローンが十分な数回収できることから BAC ライブラリー有効性が示された。以上は大麦の巨大ゲノム DNA ライブラリーの効率的構築に寄与すると考えられた。

## 7. 研究目的

植物遺伝子の中には、問題土壌による栄養障害、極端な高温や低温、乾燥や高湿、紫外線あるいは放射線など様々なストレスに応答し、あるものはそれがストレス耐性として機能しているものがある。植物はこのような環境ストレスに対して積極的に応答し、ストレスから回避する機能を持つ遺伝子を進化の過程で獲得し、またあるものは捨ててきたものもあると思われる。このような種々のストレスに対して植物がどのような耐性機構を持つかを理解するためには、生理学的耐性機構の解明が重要であるが、生理・生化学的研究から形質を司る蛋白質を探索することは非常に長年の研究が必要であった。一方ストレス耐性に関与する遺伝子の内単一の遺伝子座をマッピングすることは遺伝学の中心的研究課題であった。今日これまでの形態や生理、生理学的遺伝子マーカーに変わって、制限酵素断片長多型 (RFLP) DNA マーカーが遺伝子連鎖分析を迅速にまた精密にした。さらに、形質はこれまで定性的形質として評価されていたものも量的形質(Quantitative Trait Loci)として再評価され、これまでマッピングさへできなかった複数の遺伝子座が関与する QTL も一度の QTL マッピングでその座位を決定できるに至った。以上のような分子遺伝学の進歩は、さらにストレス応答遺伝子(群)のマップベースクローニングへ展開している。本研究「III. 酸性土壌アルミニウムストレス下における大麦種子根と冠根の異なった応答機構」、「IV. 酸性、アルミニウムストレス下の水耕栽培における大麦根の応答機構」から酸性/アルミニウム耐性関連遺伝

子(群)は複数あることが推定された。それらの応答遺伝子群をマップベースクローニングするためには、本研究 V 「遺伝子連鎖分析用 F<sub>2</sub> 集団と新しい分子マーカーを開発した大麦制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) 地図作成」を利用したそれら遺伝子を量的形質座位 (Quantitative Trait Loci)を遺伝子連鎖分析 (QTL mapping)することや、本研究 (VI)の巨大ゲノムライブラリー作成が重要である。ところで、これまで最大 40kb の遺伝子断片をクローニング技術では、1cM 離れた RFLP マーカー間の DNA(200-2000kb)を効率的に解析できない。このため、巨大 DNA 断片クローニング技術の酵母人工染色体(YAC)ベクターや<sup>1)</sup>、ファージの複製開始点と相同組み替え、ファージ頭部へのパッケージングを利用した P1 ベクターや、プラスミドの複製開始点を利用した大腸菌人工染色体(BAC)ベクターが開発された<sup>2)</sup>。YAC では巨大 DNA 断片同士がランダムに結合後ベクターにクローニングされる現象(キメラ)があるため、また P1 ではクローニングされる遺伝子のサイズが 100kb 以下に制限されるため、現在では BAC によるライブラリーが一般的である<sup>3)</sup>。例えば、イネはそのゲノムサイズの小さく 1cM は約 200kb であり、その座位が DNA マーカーでマップされた形質遺伝子はその近傍 DNA マーカーを含む巨大ゲノミック DNA 断片(BAC クローン)があれば非常に効率的に単離されている<sup>4、5)</sup>。本研究が材料とする大麦のゲノムサイズはイネの約 10 倍であり<sup>6)</sup>、巨大ゲノミック DNA ライブラリー作成は重要である。現在の BAC ベクターはそのクローニングサイトの制限酵素の種類が少ないこと、またそのためにクローニングされた巨大 DNA 断片の両端 DNA 断片をクローニングすることが容易でないことなど改良点が上げられている。また、大腸菌へ巨大 DNA-ベクター DNA を導入する効率向上などより効率的な作成法の開発が望まれている。以上より、本研究ではイネを材料に効率的巨大ゲノミック DNA ライブラリー作製法開発を目的とした。

## 8. 材料と方法

### プラスミド:

現在広く利用されている BAC ベクター pBeloBAC11 は開発者 R.A.Wing 博士から分譲された<sup>7)</sup>。また多くのクローニングサイトは市販の pNEB193(NEW England Biolabs, USA)を用いた。市販の大腸菌宿主 DH10B (BRL, USA)と、市販の細胞遺伝子導入装置 (BRL, USA)を用いて同装置の使用法に従い形質転換した。

### pBeloBAC11 の改良ベクター pCHR8 の構築:

pNEB193 のマルチクローニングサイト領域にある HincII サイトに、化学合成された SmaI サイトリンカー、5'-GATTTAAAT-3' と 5'-ATTTAAATC-3' (アンダーラインが SmaI site)を導入した pCHR1 を作成した(Fig. 1)。挿入した 9 塩基対は pNEB193 のマルチクローニングサイト機能 (α-コンプリメントする lacZ のコーディングフレーム)を失なわせなかった。一方 BAC ベクター pBeloBAC11 のクローニングサイトである HindIII サイトに化学合成した NheI, MluI リンカー、5'-AGCTTGGGCTAGCTACGCGTG-3', 5'-AGCTCACGCGTAGCTAGCCCA-3' (アンダーラインは NheI, MluI 部位)を正方向に導入した pCHR5 を作成した。この pCHR5 は挿入によりそのマルチクローニングサイト機能

( $\alpha$ -コンプリメントする lacZ のコーディングフレーム) を失なわせなかった。 pCHR1 を EcoRI/HindIII で切断して得られるマルチクローニングサイトを含む 90bp の DNA 断片を pCHR5 の EcoRI/HindIII サイトに挿入連結した pCHR8 を作成した(Fig. 2)。

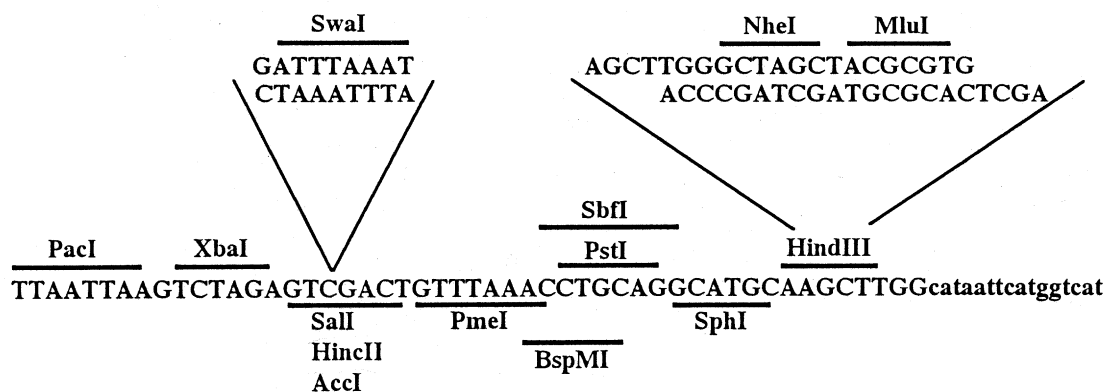


Fig. 1 Structure of a newly constructed BAC Vector, pCHR1 and the nucleotide sequence for a part of the multicloning sites in pNEB193.

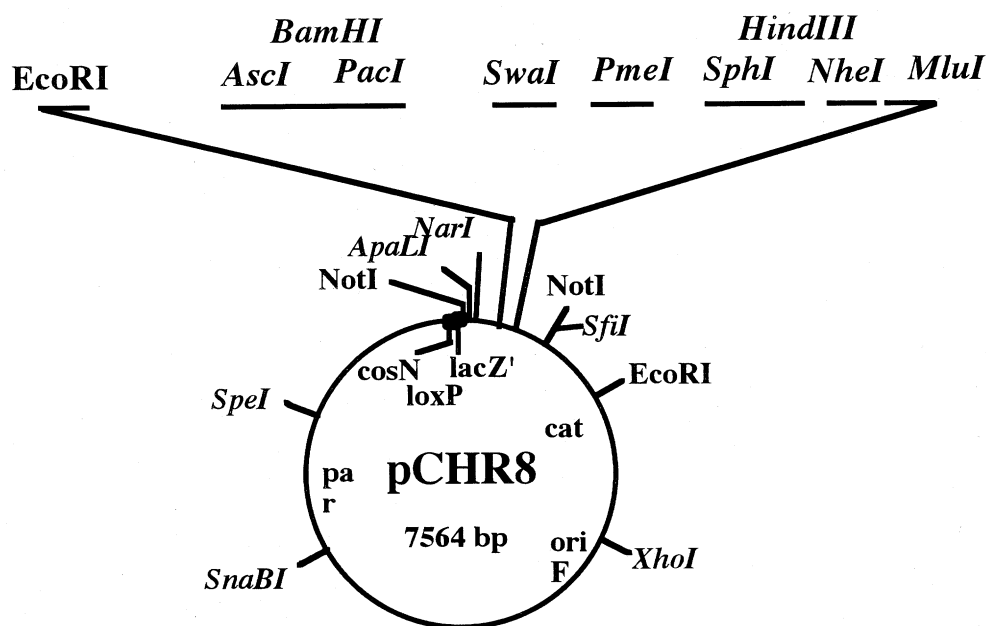


Fig. 2. Structure of a newly constructed BAC Vector, pCHR8 and the nucleotide sequence of the multicloning site. Unique restriction sites are shown by italics. LacZ:  $\beta$ -galactosidase gene for  $\alpha$ -complementation, cat: chloramphenicol acenyltransferase gene, oriF: essential region for replication of F plasmid, par partition locus of F plasmid, cosN: bacteriophage  $\lambda$  terminase recognition site, loxP: bacteriophage P1 Cre recombinase recognition site. The DDBJ accession number for the total sequence of pCHR8 is AB05619.BAC

#### ゲノミックライブラリー作成法の改良：

##### BAC ベクター pCHR8 DNA の調製

pCHR8 の DNA は常法のアルカリ溶解法<sup>8)</sup>で抽出後、塩化セシウム密度による超遠心法で精製した。精製された pCHR8 は HindIII で完全切断後、Calf intestine alkaline phosphatase (Takara, Japan) で脱リン酸化した。その脱リン酸化処理の効率は、処理ベクターの自己連結させその効率で評価し、その効率は非処理ベクターの 95%減少させる効率とした。

##### 植物材料：

インド稲品種 Kasalath の種子を 70%アルコールで 1 分滅菌後さらに 10%次亜塩素酸で 15 分滅菌した。その後 30 分水洗いして暗所、25°C で 12-14 日間発芽させ、-80°C に保存した。

##### イネの巨大 DNA 調製：

暗所発芽させたイネから常法<sup>9)</sup>に従って核分画を調製した。最終的に 70 g のイネから核ペレット (0.8ml) を調製し、それを低融点の 1%アガロース (SeaPlaque GTG agarose; FMC, USA) と混合し、80 µl のプラグ (Bio-Rad, USA) に埋め込み 4°C, 30 分で固形化した。そのプラグを 0.5M EDTA pH9.0, 1% Sodium lauryl sarcosine, 0.1 mg/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany) で 50°C, 2 日間処理した。処理後、proteinase K を不活性化するために、蛋白質分解酵素阻害剤 0.1 mM phenylmethanol sulfonyl fluoride (PMSF) を含む 0.5 M EDTA pH9.0 で 4°C, 1 時間処理した。最後にそのプラグは 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH8.0 (TE) で 4°C, 1 時間洗浄して PMSF を除き、4°C で、TE 中で保存した。

##### 巨大 DNA の HindIII 部分切断：

イネ核を含むプラグは常法<sup>10)</sup>に従い HindIII 反応液中で室温で 1 時間置いた。その後、65°C, 15 分でプラグを溶解後、37°C, 5 分置いた。各プラグ (80 µl) は約 40 µg DNA を含み、それに 0.2 単位の HindIII を加え、さらに 37°C, 30 分反応させた。反応停止のために 0.5 M EDTA pH8.0 を 8 µl 加えた。部分切断したイネ DNA はパルスゲル電気泳動装置 (CHEF Mapper, Bio-Rad, USA) で次のように精製された<sup>11, 12)</sup>。部分切断 DNA を 1% SeaPlaque GTG ゲルで、1 x TAE 電気泳動緩衝液<sup>8)</sup>, 6 V/cm, 直線 ramp pulse 時間 0.22-93.7 秒、11 時間 4°C で電気泳動して、低分子 DNA を高分子 DNA と分離した。ほぼ泳動ゲルウエルにあるゲル断片をさらに新しい 1% SeaPlaque GTG agarose を前述の条件で 15 時間泳動した。同時に泳動したラムダラダー PFG マーカーと Mid Range II PFG マーカー (New England Biolabs, USA) をエチジウムブロマイド染色し、そのサイズを指標に、150kb-300kb の領域をゲルから切り出した。

##### BAC ライブラリー構築：

150-300kb を切り出したゲルを 65°C, 15 分溶解し、ゲル 100mg 当たり 1 単位の GELase (Epicentre, USA) で 45°C, 1 時間ゲルを分解した。分解溶液は 0.023 µm のナイロンフィルター (VSWP 02500, Millipore, USA) に載せ、シャーレ内の 30 ml の透析液 (2 mM Tris-

HCl, pH8.0, 0.2 mM EDTA)で室温で 30 分透析した。DNA 濃度は既知のラムダ DNA 溶液で検定した。40 ng のゲノム DNA と 5 ng の脱リン酸化した pCHR8 とを 50  $\mu$ l の反応液(66 mM Tris-HCl, pH7.6, 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.1 mM ATP)中で 0.5 単位の T4 ligase (Nippon gene, Japan)で、16°C, 24 時間連結反応させ、4°C で保存した。0.5  $\mu$ l の連結反応液を 13  $\mu$ l の大腸菌宿主、ElectroMAX DH10B に BRL の Cell-Porator で以下のような条件で形質転換した。すなわち、330 voltage, 330  $\mu$ F capacitance, low ohms impedance, fast charge rate, 4000 ohms Booster resistance を条件とした。形質転換処理後、1ml の SOC<sup>8)</sup>を加えて、15 ml プラスティックチューブに移し、37°C, 150rpm で 1 時間培養した。培養液は 12.5  $\mu$ g/ml Cm を含む LB 寒天培地に 240  $\mu$ l の 2% X-gal, 20  $\mu$ l の 100 mM IPTG とともに塗布した。36 時間、37°C で培養後、コロニーの色が白い組換え体と青い非組換え体が明瞭に区別できた。白いコロニーを各穴に 100  $\mu$ l の LB freezing 溶液<sup>1)</sup>が入った 96 穴のマイクロタイターに接菌し、37°C で 18 時間培養後-80°C で保存した。

DNA マーカー :

イネ RFLP マーカー、XNpb15, 23, 44, 132, 187, 342, 394 はイネマッピンググループ 1991<sup>13)</sup>から分譲された。また、3 種のイネ葉緑体遺伝子断片<sup>14)</sup>、psbA, ndhA, rbcL と 6 種のミトコンドリア遺伝子断片<sup>15)</sup>、atpA, cox I, nad3, coxII, cob, atp9 は東京大学平井博士から分譲された。

サザンハイブリダイゼーション :

BAC のプラスミド DNA は 12.5  $\mu$ g/ml の Cm を含む 5 ml の LB 液体培地で一晩培養したものを自動プラスミド抽出機(クボタ PI50)で抽出した。約 500 ng の抽出 DNA を 5 単位の NotI で 37°C, 3 時間切断した。NotI 切断 BAC DNA を CHEF Mapper でパルスフィールドゲル電気泳動した。すなわち、0.5 X TBE 泳動緩衝液で 1% PFC agarose (Bio-Rad, USA)ゲル、直線的ランプ時間 0.22-12.2s で 15 時間、11°C で電気泳動した。その後ゲルはナイロンフィルター、Hybond N+に転写した。常法<sup>8)</sup>によりプレハイブリダイゼーションし、プローブはアイソトープ法でラベルした。

高密度コロニーフィルター作成

96 穴マイクロタイター 32 枚(3072 クローン)は 12.5  $\mu$ g/ml の Cm を含む LB 寒天培地の上 (Nunc Omuni tray)にのせた Hybond-N+ フィルターに、Biomek 2000 workstation (Beckman, USA)の 96 ピンを用いて 6x6 グリッドパターンでドットした。ネガティブコントロールは 6x6 グリッドの 7, 10, 25, 28 の位置に配置した。BAC クローン培養液を接菌したフィルターを載せたトレイを 37°C, 18 時間培養した。常法<sup>9)</sup>によりコロニーハイブリダイゼーションした。

プラスミドレスキュー :

HindIII サイトにクローニングされたイネ DNA 断片の両端の DNA 断片を単離する場合、右

端を単離するためには、約 50 ng の BAC DNA を BamHI あるいは SphI で切断、左端を単離するためには、MluI あるいは NheI で 37°C、3 時間切断した。切断後 16°C で自己連結させ、前述のエレクトロポレーション法で ElectroMAXDH10B 細胞に形質転換した(Fig. 3)。さらに、Cm 耐性のコロニーを解析した(Fig. 4)。

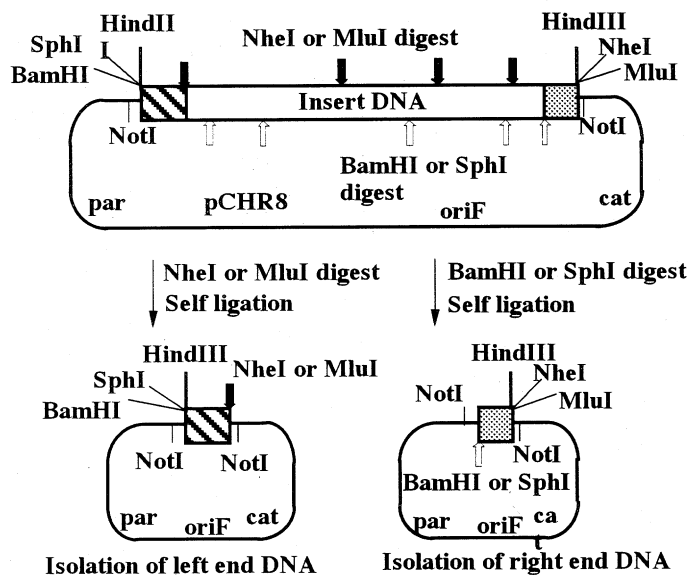


Fig. 3 pCHR8 を用いたクローニング DNA 両端 DNA 断片単離手法スキーム

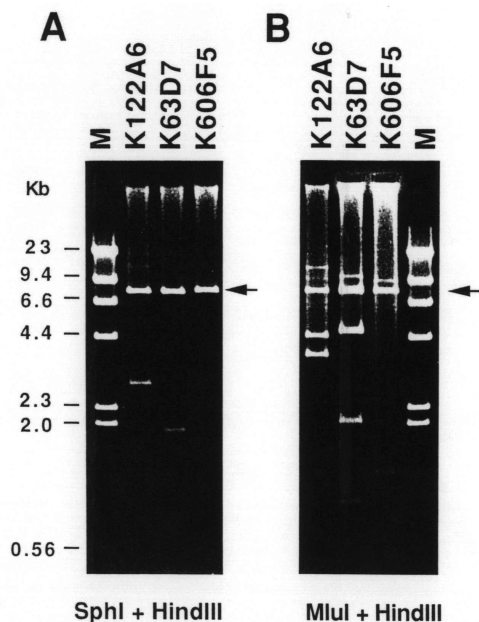


Fig. 4 プラスミドレスキューにより得られた末端 DNA 断片のゲル像

## 9. 結果

9箇所のユニークサイトを持つ新規 BAC ベクター pCHR8 の作成：

このベクター pCHR8 は pBeloBAC11 のマルチクローニングサイトを改良したものである (Fig. 1)。そのクローニングサイトは、4つのユニークな 8塩基認識制限酵素である、AscI, PacI, SmaI, PmeI サイトと5つのユニークな 6塩基認識制限酵素である、BamHI, SphI, HindIII, NheI, MluI サイトである (Fig. 2)。この改良は、このベクターの lacZ 依存のコロニー選抜に影響を与えなかった。また、pCHR8 は 12.5 µg/ml の Cm を含む LB 培養による大腸菌宿主 DH10B 内で安定に増殖した。ゲノム DNA から制限酵素で部分切断し巨大 DNA を得る時、植物では一般に制限酵素 HindIII が用いられる (x)。これまでクローニングプラスミドレスキュー法は BAC クローンの末端 DNA 断片を単離するのに、容易で正確な方法であることが知られている。すなわち、巨大 DNA の端の DNA をプラスミドレスキュー法でクローニングするためには、HindIII サイトの両側にユニークな制限酵素サイトが必要である。しかし、これまでの pBeloBAC11<sup>7)</sup> や pECSBAC4<sup>16)</sup> では HindIII の片側には BamHI や SphI があったが、他方には適当な制限酵素サイトがなかった。このことから、本研究では HindIII の片側に、遺伝子コーディング領域は CG の多い CG island であることが多いことから<sup>17)</sup>、認識塩基対に CG の多い NheI(GCTAGC), MluI (ACGCGT) を挿入したプラスミドレスキュー法を開発した (Fig. 4)。

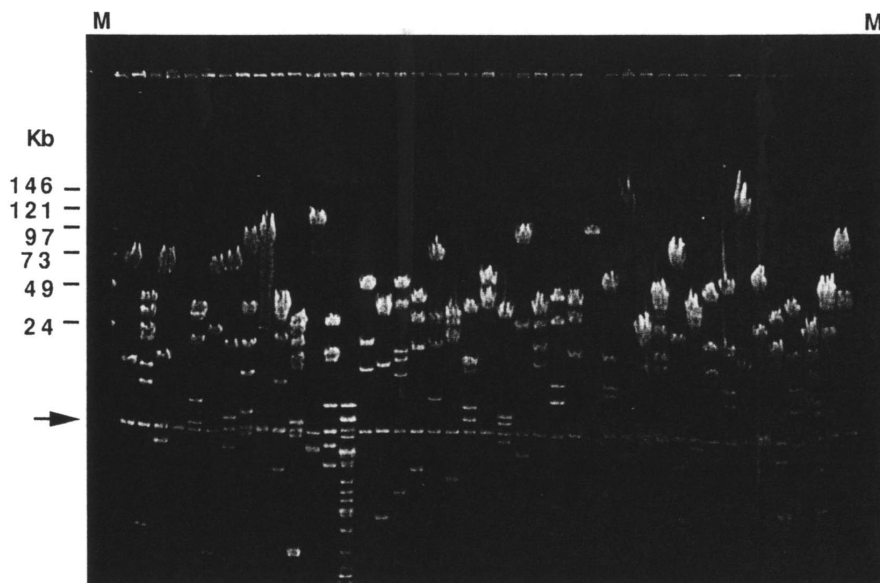


Fig. 5 クローニングされた巨大 DNA 断片の Ethidium bromide 染色ゲル像

インド稲 Kasalath の BAC ゲノミックライブラリーの構築：

本研究では、65,000 のクローンを持つライブラリーを一度の連結反応 (50 µl) により作成した。低い連結反応効率で作成されたライブラリーを数多く統合しても、そのライブラリーから特定なクローンを選抜する効率は高くない。また、90%以上の Cm (Chloramphenicol) 抵抗性のクローンは白いコロニーであった。連結反応液 1 µl 当たり約 1400 の組換えクローン

が得られた。すなわち、クローニング効率はプラスミドベクター当たり、 $1.4 \times 10^7$  であり、この効率は連結反応後 3 週間減少しなかった。連結反応、形質転換から全 BAC クローン 6,5000 を  $-80^\circ\text{C}$  に保存するまで 2 ヶ月を要した。ベクターに挿入されたイネ巨大 DNA の長さは、制限酵素 NotI で切断後パルスフィールド電気泳動して確認した(Fig. 3)。調査した 108 の BAC クローンの全てに 50-265kb の DNA 断片がクローニングされていた(Fig. 6)。

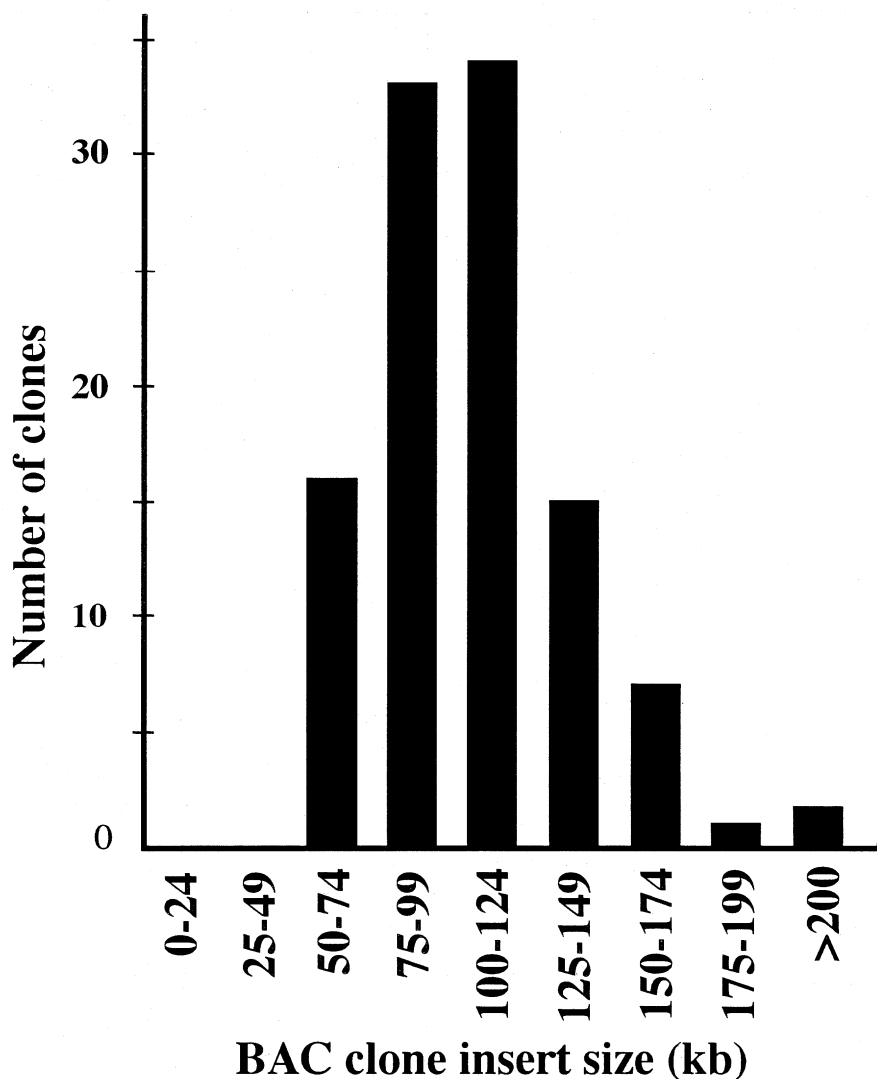


Fig. 6 インド稲 Kasalath BAC ライブラリーに含まれるクローニング断片長

以上から、イネのゲノムサイズを  $4.3 \times 10^8\text{bp}$  とすれば<sup>6)</sup>、このライブラリーの大きさはイネゲノムの約 16 倍に相当した。またこのことは Zhang と Wing によれば<sup>7)</sup>、これらクローンが全て整列化する確率が 99.9%であることを示していた。



イネ RFLP マーカーによる BAC ライブラリー選抜とそのクローン数：

このライブラリーが特定の DNA クローンを含む確率を検討するために、イネ第 2 染色体の 1 種の RFLP マーカー、Xnpb132, 3 染色体の配偶子致死因子(lethal factor)に近接する 3 種の RFLP マーカー、Xnpb15, 23, 394, 第 6, 8, 11 の染色体にある Xnpb342, 187, 44 の各々をプローブにして、6 枚の高密度クローンナイロンフィルター(6x3072=1,8432 の BAC クローン)のコロニーハイブリダイゼーション選抜を行った。また選抜されたクローンの DNA はパルスフィールド電気泳動し、DNA をナイロンフィルターに転写後同じプローブでサザンハイブリダイゼーションして確認した。その結果、それらのプローブ DNA と相同な領域を持つクローンは 1,8432 クローンの中には少なくとも 2 クローンあり、染色体 1 1 では最大 9 クローン、平均で 5.7 クローンであった (Table 1)。つまり全体の 6,5000 クローンの中には少なくとも 7 クローン、最大で 32 クローン、平均で 20 クローンであると推定された。また、1 クローンを見つけ出すには 9216 クローン(9216 x 106= 976,896kb)スクリーニングする必要がある。すなわち、その長さは約ゲノムの 2 倍であり、整列クローンの内オーバーラップする部分の総和が最大でゲノムサイズとほぼ等しい 517Mb であることを意味していた。

Table 1 . イネ R F L P マーカーでスクリーニングした BAC クローン数

RFLP marker	Chr.	Numbers of positive clone	Insert size (kb)
Xnpb132	2	2	125, 105
Xnpb23	3	5	105, 95, 100, 125, 90
Xnpb15	3	6	90, 85, 105, 170, 120, 90
Xnpb394	3	3	75, 95, 90
Xnpb342	6	7	175, 75, 110, 145, 75, 250, 175
Xnpb187	8	8	125, 110, 125, 120, 125, 110, 165, 135
Xnpb44	11	9	260, 90, 135, 135, 255, 85, 70, 80, 115
Total No.		40	
Average clone		5.7	
Average insert (kb)			122

BAC ライブラリーの葉緑体，ミトコンドリア遺伝子によるスクリーニング：

3 種の葉緑体遺伝子は 15-60kb 離れて存在し<sup>14)</sup>，また 6 種のミトコンドリア遺伝子は 10-210kb 離れて存在している<sup>15)</sup>。18,432 の BAC クローンの中には 3 種の葉緑体遺伝子と相同なクローンが 512 こ，6 種のミトコンドリア遺伝子をもつクローンは 80 こスクリーニングされた。すなわちイネの葉緑体ゲノムサイズは約 140kb、ミトコンドリアゲノムサイズは 400kb であることを考慮すると、この BAC ライブラリーにおいて、少なくともその 2.8%，最大で 6.4%が葉緑体遺伝子を含み、また、ミトコンドリア遺伝子は少なくとも 0.4%，最大で 0.8%が含まれると推定できた。

## 10. 考察

本研究で構築した新しい BAC ベクター pCHR8 は、lacZ に基づく発色で選抜ができる。また、4 種のユニークな 8 塩基認識制限酵素と 5 種のユニークな 6 塩基認識制限酵素クローニングサイトを持つ。8 塩基認識制限酵素は 4<sup>8</sup> 塩基毎にその切断が行われる rare cutter enzyme であり、クローニングされた巨大 DNA の物理的制限酵素地図作成に有用である。特に穀物ではメチル化非感受性 MluI 認識部位はゲノム全体に均等に分布せず遺伝子密集領域にあることが指摘されていることから<sup>17)</sup>、それらのマップベースクローニングには有効である。また、BAC クローンをも目的遺伝子まで整列させながら進むクローモソームウォーキングには BAC クローンの末端 DNA 断片調製が必要である。この調製にはこれで、Vectrette-PCR<sup>18)</sup>、Tail-PCR 法<sup>19)</sup>が開発されているが、容易な手法ではない。一方 pCHR8 を用いたプラスミドレキュー法は正確で容易な方法であり、マップベースクローニングを加速化すると考えられた。

現在イネでは 6 種の BAC ライブラリーが報告され<sup>4, 5, 7, 10, 20)</sup>、それらの平均クローニング断片長は 107-155kb である。しかし、それらのライブラリーの大きさは、数回の連結反応の総計であり、最大でもイネのゲノムサイズの 7 倍である。すなわち、低い連結効率 ( $4 \times 10^5$ )<sup>10)</sup> ではクローニング効率も低いと、それらのゲノムライブラリーは十分でないと考えられた。一方、本研究で作成されたライブラリーは平均サイズは 106kb と短い。このことは連結する巨大 DNA サイズを 150-300kb に制限したためである。平均サイズとクローニング効率の逆相関についてはすでに報告されているように、本研究においてもより長い 300-500kb の巨大 DNA を用いると平均サイズは 139kb と高まるが、そのクローニング効率は 1/100 に減少した (data not shown)。また、エレクトロポレーション法により BAC クローンを大腸菌宿主へ遺伝子導入する効率は YAC クローンを酵母宿主に導入する場合より高いため従来からエレクトロポレーション法が用いられてきた。本研究では、クローニング効率 (連結反応効率・導入効率) が  $1.4 \times 10^7$  と従来に比べ約 400 倍高い。そのライブラリーの大きさも従来に比べ約 2 倍で 99.9% の確率で全ゲノムをカバーできると推定された。以上まとめると、本研究における BAC ライブラリー作成法は次の 3 点の改良により、従来法に比べより効率的であると考えられた。すなわち 1) サイズセレクションで低分子 DNA を除く、2) 目的サイズ以上の高分子 DNA を除く、3) 連結反応におけるベクターと巨大 DNA の適切な分子比である。さらに本 BAC ライブラリー作成法は、巨大なゲノムサイズを持つ大麦の酸性・アルミニウム耐性関連遺伝子群のマップベースクローニングにおける、BAC ライブラリーの効率的作成に寄与すると結論した。

## 11. 今後の展開

本研究によって巨大なゲノムサイズを持つ大麦の酸性・アルミニウム耐性関連遺伝子群のマップベースクローニングにおける BAC ライブラリーの効率的作成法が開発された。すなわち、1 回の連結反応と 100 回の形質転換、そのクローン保存に三ヶ月でほぼオオムギの 1 ゲノムサイズ相当のクローンが得られる。しかし十分なクローン数はこの 10 倍であることから、いくつかの研究室による共同研究が現実的である。今後は本研究 III, IV で解明された酸

性・アルミニウム耐性関連遺伝子群を 1) QTL マッピングし, さらに 2) それら遺伝子により近傍な DNA マーカーを探索 (タギング) して詳細な DNA マップを作成すると同時に本研究 VI の方法をさらに効率化することにより BAC ライブラリーを効率的に作成する予定である。

## 1 2 . 参考文献

1. Burke, D.T, G. F. Carle, M. V. Olson Science 236, 806-812
2. Shizuya, H. et al., Proc. Natll. Acad. Sci. USSA 89. 8794-8797, 1992
3. Wang, K. et al., Biotechniques, 23, 992-994, 1997
4. Yang, D, A., et al., Theor Appl Genet 97, 1120-1124, 1998
5. Nakamura S., et al., Mol Gen Genet 254, 611-620, 1997
6. Arumuganathan, K., E.D. Earle Plant Mol. Biol. Rep. 9, 208-218, 1991
7. Kim, U., et al., Genomics 34, 213-218, 1996
8. Sambrook, J, E..F. Fritsch and T. Maniatis, A laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989
9. Zhang, H.B., et al., Plant J. 7, 175-184, 1995
10. Zhang, H.B, et al., Mol. Breed. 2, 11-24, 1996
11. Woo, S., et al., Nucl. Acids Res. 22, 4922-4931, 1994
12. Asakawa, S., et al., Gene 191, 69-79, 1997
13. Saito, A., et al Jpn. J. Breed. 41, 665-670, 1991
14. Hiratsuka, J., et al., Mol. Gen. Genet. 217, 185-194, 1989
15. Iwahashi, M., et al., Theor. Appl. Genet. 84, 275-279, 1992
16. Friuters, A. C., et al., Theor. Appl. Genet. 94, 390-399, 1997
17. Zhang, H. B., R. A. Wing, Plant Mol. Biol. 35, 115-127, 1997
18. Moore, G., S. et al., Genomics 15, 472-482, 1993
19. Riley, J. et al., Nucleic Acids Res. 18, 2887-2890, 1997
20. Liu YF, RF Whittier, Genomics 25, 674-681, 1995
21. Tao, Q. Z., H. Y. Shao, L. F. Qiu and G. F. Hong, Cell Res. 4, 127-133, 1994
22. Wang, G. I., Plant J. 7, 525-533, 1995

## 1 3 . 研究業績

### 1 3 1 . 原著論文

1. C. Miyazaki and A. Saito: Construction and Characterization of a Bacterial Artificial Chromosome Library of the Indica Rice Kasalath. Breeding Science 49, 193-201, 1999

### 1 3 2 . 総説 なし

### 1 3 3 . 国際学会発表 なし

### 1 3 4 . 国内学会発表 なし

1 3 4 新聞 なし

1 3 5 特許 なし

#### 1 4 . 英訳

- (1) Research Title : Tolerance Mechanisms for Aluminium stress in plant  
Research sub-title : Construction of a Bacterial Artificial Chromosome Library of Rice
- (2) Research organization : Labo. of Plant Biotech, Kyushu National Agricultural Experiment Station (KNAES)
- (3) Researcher : Akira Saito
- (4) Co-researchers : Chikara Miyazaki (JISTEC, Nagasaki)
- (5) Research periods : 1995-1999
- (6) Abstract

Construction of BAC library for big-sized genomic DNA in this study is important for the map-based cloning of the acid/aluminium resistance genes. Although big-sized DNAs longer than 300 kb were cloned with a yeast artificial chromosome vector, it often contained chimerical insert DNA which occurred during the construction procedure. Therefore, we constructed a bacterial artificial chromosome (BAC) library for the indica rice variety Kasalath using a new BAC vector, pCHR8, suited for plasmid rescue, containing nine unique restriction sites in a multicloning site. This Kasalath BAC library consists of about 65,000 clones with an average insert size of 106 kb using HindIII partially digested DNA fragments. It represents approximately sixteen rice haploid genome equivalents which are sufficient for the full coverage of the rice genomic with BAC clone contigs. The library was constructed from only a single ligation mixture with high transformation efficiency. The quality of this BAC library was ascertained by successfully retrieving the BAC clones for seven rice RFLP markers. We could isolate eleven individual BAC clones using RFLP markers that linked to the lethal factor locus for segregation distortion on rice chromosome 3. The content of the chloroplast and mitochondria DNA in this library was estimated to be 2.8% and 0.4%, respectively. These results demonstrate that this improvement of BAC library should be suitable for map-based cloning and physical mapping of acid/aluminium stress response related gene(s).