

**[成果情報名]** アウリントリカルボン酸を利用した米麹からの簡便RNA抽出法

**[要 約]** 醗酵食品においては醗酵過程に微生物が生産する種々の核酸分解酵素の活性が高く、またRNA等の核酸は澱粉質との分離が困難であるため、そのような試料から高品質のRNAを簡便に精製することはこれまで困難であった。我々は核酸保護物質アウリントリカルボン酸(ATA)を用いて米麹等の多量の澱粉質を含む醗酵食品試料より、試料中の微生物のRNAを簡便かつ安定に抽出する方法を開発した。

**[部 署]** 食品総合研究所・応用微生物部・糸状菌研究室

**[連絡先]** 糸状菌研究室 029-838-8077 satosuz@nfri.affrc.go.jp

**[成果区分]** 参考

**[キーワード]** 麹菌、RNA抽出法、アウリントリカルボン酸(ATA)、米麹

---

**[背景・ねらい]**

これまで、醗酵食品試料からのRNA抽出、特に米麹のような澱粉質を多量に含む試料から醗酵中の食品微生物の発現遺伝子をリアルタイムに検出するための高品質なRNAを抽出することは困難であった。その理由としては(1)醗酵食品中の核酸分解酵素活性が高い(2)澱粉等の多糖類を多量に含むため精製操作が煩雑となり(1)とあいまって、多段階の精製操作中に試料中の強力な核酸分解活性によりRNAが分解してしまう、の2点が挙げられる。従って強力なRNA保護剤の採用と精製操作の簡便化が問題解決に重要であると考えられた。従来法では、試料や器具に含まれる核酸分解活性をグアニジンチオシアネートによるタンパク質変性により抑制し、核酸と多糖の分離は、遠心分離操作において微妙に遠心力や遠心時間を調整することで行なっていた。しかし、試料の核酸分解活性が高いため、タンパク質変性剤を用いても、常に冷却を保ち迅速な操作を行わなければRNAの分解を完全に抑えることは出来なかった。また、遠心条件の微妙な調整による核酸と多糖の分離は、精製度と収量という二律背反する要求の妥協点を溶液の濁度の目視等による主観に基づき経験的に判断して行っており、更に核酸保護能力の不足分を冷却で補うことにより核酸と多糖がより同時に沈殿しやすい状況を作り出すため困難を伴っていた。そのような従来法の問題点を解決し、操作に熟練を要せず簡便に高品質なRNAを醗酵食品試料より抽出するため、アウリントリカルボン酸(ATA)とCTABを用いる方法を開発した。本方法は、RNA精製の定法であるグアニジン塩による試料の可溶化と塩化セシウム超遠心法によるRNAの選択的沈殿による方法に加えて、ATAによる強力な核酸保護作用とCTABによる多糖の分離を組み合わせた方法である。

**[成果の内容・特徴]**

1. 本方法はATAを用いることによりRNAを核酸分解酵素より保護する。ATAは核酸及び核酸分解酵素に強固に結合し核酸を分解から保護するため、精製操作中のバッファー交換時などもRNAを保護し続けることが出来る。従って抽出バッファー中のタンパク質変性剤等の一般的な核酸分解酵素阻害剤の働きが期待できない状況でも、RNAの分解を防ぐことが出来る上、精製操作中の核酸分解酵素の混入に対しても核酸保護効果を発揮する。ATAを用いる方法はイネの研究グループによる生米からのRNA抽出の実績があり、また動物組織からのRNA抽出法としても報告があるが、CTABと組み合わせた醗酵食品への応用は初めてである。
2. 本方法では米由来の多量の糊状成分をCTAB法と超遠心により2段階で除去する。第一段階の遠心分離ではCTABにより不溶性の糊状成分とタンパク質の大部分を除去する。さらに上清中の不純物を5.7M塩化セシウム超遠心法により除去して高純度のRNAを沈殿として回収する。その際ATAの大部分もRNAから除去されると考えられる。
3. 本方法では無傷の長いmRNAも取得できる。本方法により抽出した全RNA中から定法に従いmRNAを

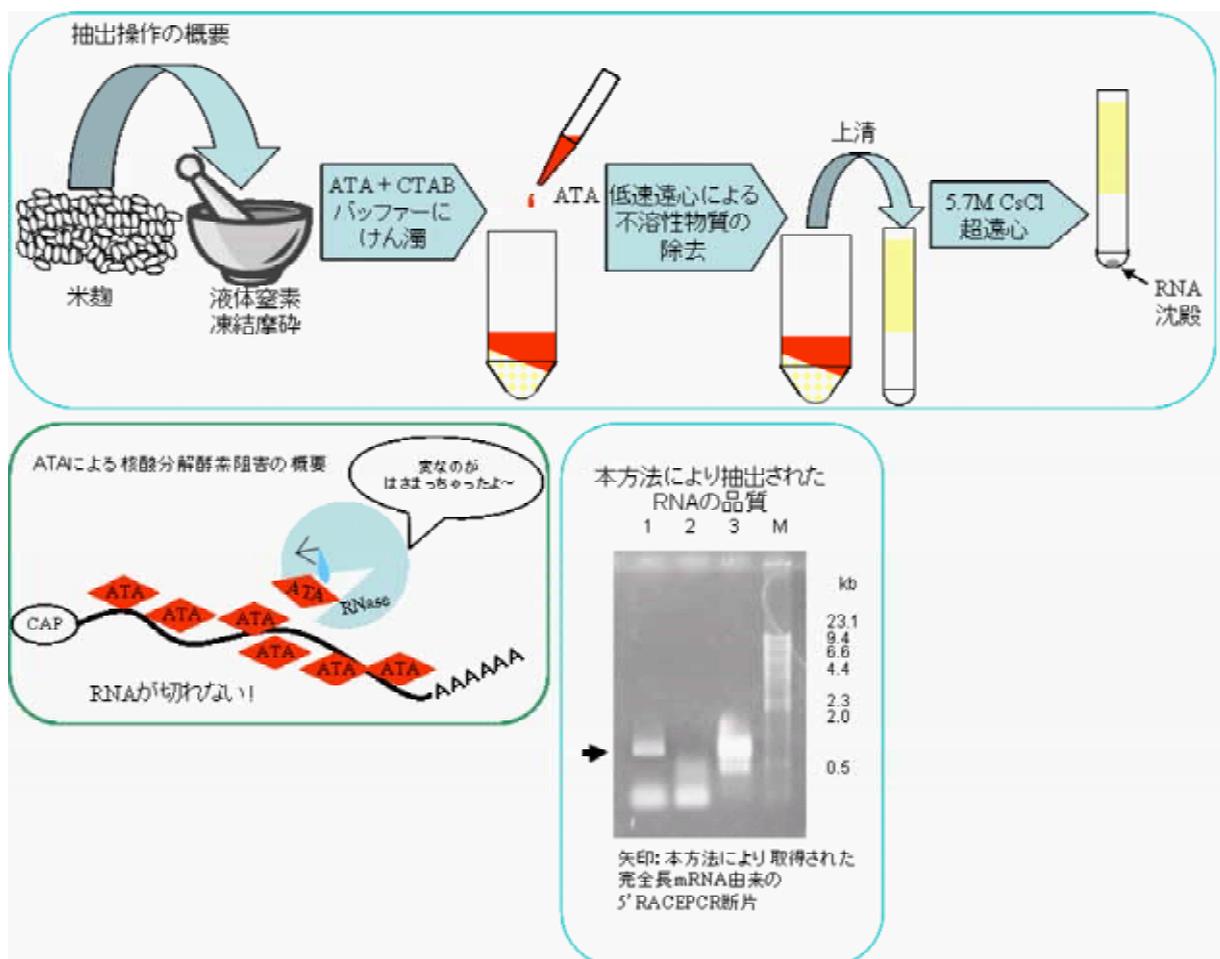
精製し、5' RACE法により末端配列を確認したところ、5' キャップ構造を持つ完全長のmRNAが含まれていることが明らかとなった。

4. 本方法により、従来法に比べて全RNAにして約5倍の収量（米麹10gあたり500から800  $\mu\text{g}$ ）を挙げた。また、RACE反応等を例とする各種酵素反応に利用できる高純度のRNAを得られた。

### [成果の活用面・留意点]

醗酵醸造食品中の微生物の遺伝子発現をモニタリングすることで、醗酵過程の解析を行うことが出来る。また、それにより醗酵工程の最適化に必要なデータを得ることが出来る。また、これまで解析が困難であった、米麹等の固体培養時に特異的に発現する有用酵素遺伝子等の探索にも役立つ。

### [具体的データ]



### [その他]

研究課題名：麹菌の形態変化に伴う高発現遺伝子の制御機構の解析

予算区分：交付金プロジェクト（形態生理）

研究期間：2001～2003年度

研究担当者：鈴木聡、柏木豊

発表論文等：

- 1) 鈴木聡、他 4 名：アウリントリカルボン酸アンモニウムを用いた米麹からの麹菌全 RNA 抽出法の検討、食品総合研究所研究報告、68号、p33～37（2004）