

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

鈴木 聡[§], 竹谷 博子[§], 石田 博樹^{*}, 楠本 憲一[§], 柏木 豊[§]Method of total RNA isolation from *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (rice koji culture) using Aurintricarboxylic Acid Ammonium Salt (ATA)Satoshi Suzuki[§], Hiroko Taketani[§], Hiroki Ishida^{*}, Ken-Ichi Kusumoto[§], Yutaka Kashiwagi[§][§]National Food Research Institute, 2-1-12 Kan-nondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642,^{*}Research Institute, Gekkeikan Sake Co. Ltd., 24 Shimotoba-koyanagi-cho Fushimi-ku, Kyoto 612-8385,

Abstract

A simple method for total RNA isolation from *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (rice koji culture) was developed. A nucleic acid binding dye, aurintricarboxylic acid ammonium salt (ATA), was employed to prevent RNA from degradation by nuclease activity of rice koji culture. We also used cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) to remove polysaccharides, which was mainly derived from rice grains. We successfully isolated total RNA from *A. oryzae* in solid-state culture. The RNA isolated by this method was available for Northern blot analysis and as a template of reverse transcription.

(Received Nov. 11.21, 2003; Accepted Jan. 29, 2004)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は我が国の醸造醗酵産業における重要な微生物である。麹菌を物質生産に供する場合、実験室レベルの研究においては条件検討及び均一培養条件の維持を容易とする液体培養が用いられてきた。実際の伝統的醸造工程では穀物を用いた固体培養である麹が用いられている。近年の研究により、麹菌は液体培養時に比して固体培養時では遺伝子発現プロファイルを劇的に変化させることが明らかとなり¹⁾、固体培養において特異的かつ大量に分泌生産される酵素が存在することが明らかとなっている^{2,3)}。

一般に、ある培養条件下における微生物の分子生物学的研究の手法として、その培養条件下における転写産物を取得し解析することが行われている。しかしながら、固体培養時の菌体からのRNA抽出は、麹菌の強

力な核酸分解酵素による分解や穀粒あるいは麹菌菌体に由来する多糖類の混入等多くの困難を伴う。現在、小麦ふすま麹、米麹からの全RNA抽出法として、グアニジンチオシアン酸塩によるタンパク可溶化と塩化リチウムによるRNAの選択的沈殿を組み合わせた定法に従い、遠心分離の条件を改良し、多糖類とRNAを分離する手法が行われている¹⁾。RNAを分解酵素から守りつつ、こうした多段階の精製操作を行うには熟練が必要である。

一方、他生物において核酸分解酵素活性の高い組織からのRNA抽出法としてアウリントリカルボン酸(ATA)の利用が報告されている⁴⁾。ATAは核酸及び核酸結合タンパク質の核酸結合部位に結合する性質を持っており、核酸に対するほぼ全ての酵素反応を阻害す

2003年11月21日受付, 2004年 1月29日受理

独立行政法人食品総合研究所 (〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12)

^{*}月桂冠総合研究所 (〒612-8385 京都市伏見区下鳥羽小柳町24)

§連絡先: 糸状菌研究室 鈴木 聡 satosuz@ufri.affrc.go.jp

る⁵⁾。そのためATA法により得られたRNAをその後の酵素反応を伴う実験に供するためにはATAを除去する必要がある。RNAからATAを分離する方法として Sephadex G-50カラムによる方法が報告されている⁴⁾。イネ研究グループは超遠心によりRNAからのATAの分離が可能であることを報告している(私信)。植物における研究では、ゲノムDNA抽出の場合と同様にRNA抽出の際にも臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)を用いて多糖類を除去する方法が報告されている⁶⁾。

我々は米麹からの全RNA抽出法にATAとCTABを利用する方法を検討し、また、得られたRNAを用いてノーザンプロット法による転写産物の確認、rapid amplification of cDNA ends (RACE)法による5'末端配列増幅及び逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行い、本方法にて抽出したRNAがこれらの実験に供試可能であることを示した。

実験方法

菌株及び培地：本研究では麹菌*A. oryzae* NFRI 1599株を用いた。NFRI 1599株はポテトデキストロース寒天培地によるスラント培養にて維持されたものを用いた。液体培地はツァベック-ドクス培地(CD液体培地)(0.6%硝酸ナトリウム, 0.1%りん酸二水素カリウム, 0.5%塩化カリウム, 2mM硫酸マグネシウム, 1%グルコース, 0.1%トレースエレメント), 固体培地は蒸米を用いた。蒸米は、一晩4 にて蒸留水で含浸した化米(徳島精工)10gを水切りし、ガラスシャーレに広げた後121 , 15分のオートクレーブ滅菌したものをを用いた。

全RNA抽出：固体培養からの全RNA抽出は37 で三日間培養した米麹から行った。10gの米麹を乳鉢乳棒にて液体窒素中で完全に粉砕した。これに、クロロホルム-イソアミルアルコール(クロロホルムと3-メチル-1-ブタノールを49:1に混合したもの)を5ml加え十分に混合した。次に2×ATAバッファー(200mM トリスアミノメタン, 40mM エチレンジアミン四酢酸, 2.8M 塩化ナトリウム, 4mM アウリントリカルボン酸アンモニウム, 8M グアニジン塩酸, ジエチルピロカルボナート(DEPC)処理水にて調整, pH 9)を5mlと2-メルカプトエタノールを100 μ l加えてよく混ぜた。次に2×CTABバッファー(200mM トリスアミノメタン, 40mM エチレンジアミン四酢酸, 2.8M 塩化ナトリウム, 2% CTAB, DEPC処理水にて調整, pH 9)

を5ml加え, 65 10分間, 振とうした。4000 \times gにて5分間遠心し, 上層を5.7M塩化セシウム超遠心分離法で精製した。超遠心分離は定法に従いSW40Tiローター(Beckman)を用いて20 , 25000rpm, 20時間行った。

液体培養からの全RNA抽出は100mlのCD液体培地にて30 で一晩培養した菌糸を用いた。濾過により液体培地を取り除いた菌糸を乳鉢乳棒にて液体窒素中で完全に粉砕した。これを固体培養からの抽出操作と同様に抽出した。

ノーザンプロット法による転写産物の確認：液体培養RNA及び固体培養RNA各100 μ gをホルムアルデヒド変性アガロースゲルにて電気泳動し分子量に従って分離した。これをナイロンメンブレン(Hybrid-N+, Amersham Biosciences)に転写し, 定法に従いDNAプローブとのハイブリダイゼーションを行った。プローブの作成は, *glaB*遺伝子ゲノムDNAを用いてDIGプローブ合成キット(Roche)により行った。ハイブリダイゼーションの検出はCDPstar(Amersham Biosciences)による化学発光をX線フィルムに感光させることにより行った。

mRNA精製：400 μ gの米麹全RNAからmRNAを濃縮した。Poly(A) Pure mRNA Purification Kit(Ambion)を用いてキットに付属の取り扱い説明書に従い行った。

逆転写反応：上記により濃縮精製されたmRNAのうち500ngをSuperScript 逆転写酵素(Invitrogen)を用いて, 製品添付の説明書に従い逆転写反応を行った。

*glaB*遺伝子コード領域のPCR増幅：上記逆転写反応により得られた米麹由来 first strand cDNAに対して, *glaB*のコード領域の末端配列に由来するプライマー, *glaB*5' (5'-acgcgtcgacatgcggaacaacctctcttttcc-3')及び, *glaB*3' (5'-acgcgtccaccacagaccaacagttggggtagtg-3')を用いてPCR反応を行った。PCR反応条件はアニーリングが60 で30秒, 伸長反応が72 で2分, サイクル数が30サイクルであった。

RACE：上記により濃縮精製されたmRNAのうち250ngをFirstChoice RLM-RACE Kit(Ambion)を用いてキットに付属の取り扱い説明書に従い行った。5' RACEに用いたプライマーは, 著者等がジントラップ形質転換株から取得した新規遺伝子の内部配列を用いた(データ未発表)。

実験結果

米麹及びツァベック-ドクス(CD)液体培養菌体からの全RNA抽出

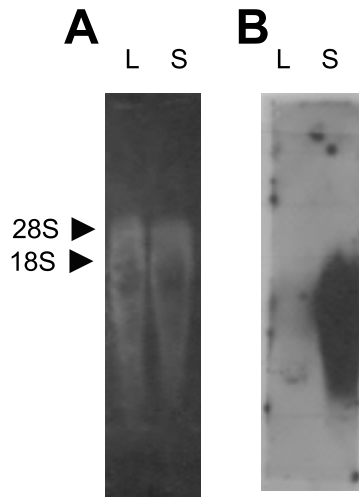


図1 total RNAの電気泳動像とノーザンプロット解析
 A:RNA変性アガロースゲル電気泳動の臭化エチジウム染色像.矢印はリボソームRNAの位置を示す.
 B:Aのアガロースゲルのノーザンプロット解析.L,ツァベックドクス液体培養菌体由来RNA.S,米麹由来RNA.プローブは*glaB*遺伝子ゲノムDNA断片を用いた.

本方法により全RNA抽出を行った結果、一晚培養CD液体培地100mlから分離した菌体及び3日間培養米麹10gからそれぞれ、1.4mg、500 μ gの全RNAが得られた。260nm/280nmの吸光度比は1.6から1.8の範囲でありタンパク質の混入が通常の実験操作に支障のない範囲であることが解った。抽出した全RNAをホルムアルデヒド変性ゲルを用いたRNA電気泳動により分離し臭化エチジウムで染色したところ、図1Aに示すように、28S及び18SのリボソームRNAのバンドが確認された。

***glaB*遺伝子をプローブにしたノーザンハイブリダイゼーション**

本方法により米麹由来の全RNAが適切に抽出されていることを示す目的で、固体培養特異的遺伝子である*glaB*遺伝子⁷⁾をプローブにして、それぞれ米麹及び液体培養由来の全RNAにおける*glaB*遺伝子の発現を確認した。第1図Bに示すとおり、液体培養菌体由来の全RNAからはほとんど*glaB*発現が検出されず、米麹由来の全RNAからは強い*glaB*発現が検出された。この結果より本方法によって、米麹から適切に固体培養特異的RNAが抽出されることが解った。

逆転写PCRによる*glaB*コード領域の増幅

図2では本方法により抽出された米麹由来全RNAから濃縮されたmRNAを鋳型とした逆転写反応及び、*glaB*

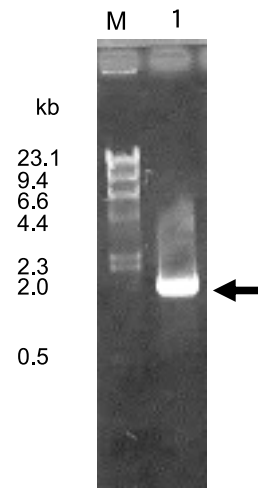


図2 RT-PCRによる*glaB*cDNAの増幅
 レーンM,DNAサイズマーカー(λ /Hind).
 レーン1,*glaB*遺伝子RT-PCR産物.
 矢印は約1.5kbの*glaB*ORFのバンド位置を示す.

遺伝子のコード領域特異的プライマーを用いたPCR反応により増幅されたDNA断片の電気泳動パターンを示した。約1.5kbの*glaB*遺伝子のcDNAのバンドが観察された。この結果、本方法にて抽出された米麹由来の全RNAは逆転写酵素反応の基質として使用できることが示された。

5'RACEによるRNA品質の検定

本方法は米麹培養における高い核酸分解酵素活性からRNAを保護しつつ抽出するためにATAを用いている。ATAは核酸を基質とするほぼ全ての酵素の働きを阻害するため、抽出されたRNAをその後の実験操作に用いるためにはATAをRNAから十分に除去する必要がある。RACE法は転写産物の5'末端および3'末端を単離する手法として一般に行われている方法であるが、RACE法を実施する過程でRNAに対して種々の核酸修飾酵素を働かせる必要がある。本方法により抽出されたRNAから適切にATAが取り除かれ、種々の核酸修飾酵素の基質になりうる事を示す目的で、5'RACEを行った。今回使用したFirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion)による5'RACE法では仔牛小腸アルカリ性ホスファターゼ(CIP)、タバコ酸性ピロホスファターゼ(TAP)、RNAリガーゼ、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ等の多種の酵素を用い、完全長の5'末端を持つmRNAに由来するcDNA断片のみを増幅する。図3は、本方法により抽出された米麹由

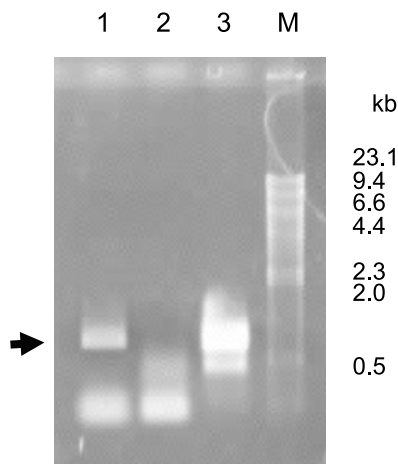


図3 5'RACE法による増幅DNAの電気泳動像

レーン1,目的遺伝子の5'末端DNA断片(約1.0kb).

レーン2,ネガティブコントロール(TAP処理を省いた以外レーン1と同様の手順にて準備したサンプル).

レーン3,ポジティブコントロール(キット添付標準RNA及びプライマーを用いてレーン1と同様の手順にて準備したサンプル).

レーンM,DNAサイズマーカー(λ /Hind).

矢印は約1.0kbの目的DNA断片の位置を示す.

来全RNAから濃縮されたmRNAを鋳型として,5'RACE法によって増幅されたDNA断片(著者らが取得した新規遺伝子)の電気泳動パターンである.レーン1には予測通りのサイズである約1.0kbのバンドが観察された.レーン2はTAP処理を行わなかったネガティブコントロールであり,レーン1に観察されたバンドがゲノムDNAの混入による物ではなく,mRNA由来のものであることを検証した.レーン3はキット添付の標準RNAを用いたポジティブコントロールである.この結果,本方法にて抽出された米麹由来全RNAは各種酵素反応の基質として使用できることが示された.

考 察

本方法を用いて米麹からノーザンプロット法,逆転写反応,RACE法における実験操作に対して質,量共に十分な全RNAを抽出できることが明らかとなった.従来法では塩化リチウム沈殿及び,フェノール-クロロホルム抽出を精製法の主体とするため,沈殿形成に一晩静置し,さらに頻りに遠心分離を繰り返す必要があり,時間と手間がかかる.加えて,RNAと多糖類の沈殿を分離する際,溶液の濁り具合を感覚的に掴み取って遠

心分離の回数や加速度を加減するために, RNAの収量や純度が作業者の習熟度に大きく影響される.これに対して本方法では,20時間の超遠心を除いた実際の作業時間は1時間ほどであり,また超遠心の沈殿物はほぼ純粋なRNAであるため誰が行っても同等の品質のRNAを得ることができる.また,10gの米麹あたりの全RNA収量は,従来法は100 μ g(赤尾ら私信)であったのに対し本方法では500 μ gであった.図1に示された臭化エチジウム染色やノーザンプロット法の結果からはRNAの分解が観察された.しかし,本方法で抽出された米麹由来全RNAから濃縮精製されたmRNAを鋳型とした逆転写PCRによって*glaB*遺伝子の1.5kbのコード領域を全て含むcDNAを取得できた.更にその後の研究では,今回RACE法に用いた新規遺伝子について同様に逆転写PCRにより5'非翻訳領域から3'非翻訳領域まで全て含む約2.5kbの完全長cDNAを取得できている(データ未発表).このため,RNaseによる分解,物理的せん断の影響を受けていないmRNAを逆転写反応等の実験に必要な量を抽出できたと判断された.図1において本方法により抽出したRNAに分解が見られたのは, RNAの量に対してATAの量が少なく,全てのRNAを保護しきれなかったためではないかと考えられる.従ってATAにより保護を受けたmRNAは無傷のまま残り,比較的長い遺伝子の完全長cDNAの鋳型とすることが出来たと想像される.これは,今回使用したATA量は植物の方法を参考に決定されたためであり,植物に比べて細胞あたりのRNA量が多いと考えられる麹菌においては今後,使用するATAの濃度を上げた実験を行いこれを検証すべきと考える.また,RACE法における種々の酵素反応も阻害されることなく進行したことから,本方法においては,超遠心による精製によりRNAからATAが十分に除去されており,得られたRNAはノーザンプロット法,cDNA合成,RT-PCR,RACEに十分使用できる品質であることが示された.

謝 辞

本研究は農林水産省交付金プロジェクト「形態・生理機能の改変による新農林水産物の創出に関する総合研究」の一部として行われた.

要 約

米麹からの麹菌全RNAの簡便な抽出法を開発した.本方法は米麹の核酸分解活性からRNAを保護するため

ATAを用い,また多糖類の除去のためにCTABを用いる.本方法により抽出されたRNAは,ノーザンプロット法及びRACE法等に供試可能であることを確認した.

文 献

- 1) Akao, T., Gomi, K., Goto, K., Okazaki, N. and Akita, O., Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture, *Curr. Genet.*, **41**, 275-281 (2002).
- 2) Hata, Y., Ishida, H., Kojima, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K. and Imayasu, S., Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture(koji) and in submerged culture, *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 532-537 (1997).
- 3) Hata, Y., Ishida, H., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K. and Imayasu, S., Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*, *Gene*, **207**, 127-134 (1998).
- 4) Skidmore, A.F. and Beebee, T.J.C., Characterization and use of the potent ribonuclease inhibitor aurintricarboxylic acid for the isolation of RNA from animal tissues, *Biochem. J.*, **263**, 73-80 (1989).
- 5) Blumenthal, T. and Landers, T.A., The inhibition of nucleic acid-binding proteins by aurintricarboxylic acid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 680-688 (1973).
- 6) Jaakola, L., Pirttilä, A.M., Halonen, M. and Hohtola, A., Isolation of high quality RNA from Bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) fruit, *Mol. Biotechnol.*, **19**, 201-203 (2001).
- 7) Ishida, H., Hata, Y., Ichikawa, E., Kawato, A. and Suginami, K., Regulation of glucoamylase-encoding gene(*glaB*), expressed in solid-state culture(Koji) of *Aspergillus oryzae*, *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 301-307 (1998).