

LAMP 法の原理と今後の技術開発の動向

池 戸 正 成

栄研化学株式会社生物化学研究所

The principle and the future trends of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method

MASANARI IKEDO

Eiken Chemical Co., Ltd. Biochemical Research Laboratory, Shimotsuga, Tochigi 329-0114, Japan

1. はじめに

Polymerase chain reaction (PCR) による遺伝子増幅法が考案されて以来,¹⁾ 分子生物学分野の研究は目覚ましい発展を遂げてきた。PCR 法の原理の詳細な説明は割愛するが、基本的には増幅したい遺伝子領域の両端に 2 つのプライマーを用意し、「2 本鎖 DNA の変性→プライマーのアニールリング→DNA 鎖の伸長」のそれぞれ反応温度が異なる 3 段階の繰り返しによって指数関数的な遺伝子の増幅を行う。従って、温度コントロール装置（サーマルサイクラー）と反応の確認のための電気泳動を必要とし、また、別途プローブを用いた検出反応も必要となるなど、試験全体の煩雑性を伴うため検査を現場で行なうのが困難となっているのが現状である。

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) は、上述の PCR 法の問題点を解決すべく、等温で一種類の合成酵素のみで増幅反応が起こり、さらに特異性を高めた新しい遺伝子増幅法として開発された。²⁾

2. LAMP 法の原理

本法は、合成された DNA の 3' 末端が常にループを形成して次の DNA の合成起点となるようプライマーを設計し、等温、一種類の酵素での増幅反応を達成する。

この特殊なプライマーの構造と LAMP 法の反応原理を図 1, 2 に簡単に示した。LAMP 法は 6 つの領域を含む 4 種類のプライマーを用いて増幅反応を行う (図 1)。これら、4 種類のプライマーと鎖置換型の DNA ポリメラーゼ、ターゲット DNA を混合して等温で反応させると、幾つかの反応ステップ (図 2, ステップ 1~8) を踏んで、FIP, BIP プライマーの構造上の特徴から両方の末端でループをまいたダンベル様構造をした一本鎖 DNA (図 2, 9) が生成される。このダンベル様構造の DNA は LAMP 反応の基点ともいえ、これから相補的な配列のダンベル様構造 (図 2, 9') が生成され、さらにこの 9' から 9 が生成される (サイクリング反応)。また、その間にステップ 15~17 を経て自分自身を鋳型と

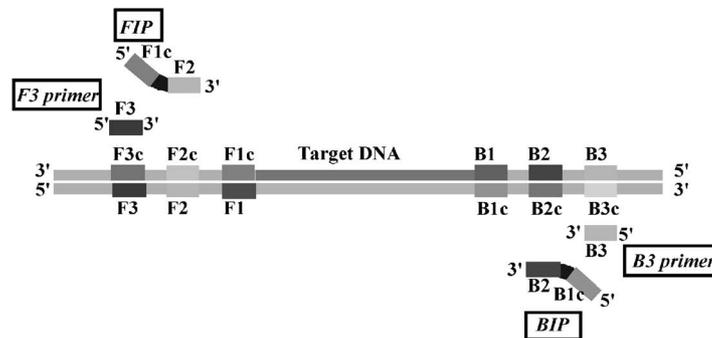


図 1 標的遺伝子と LAMP プライマーの構造

標的遺伝子の 3' 末端側から F3c, F2c, F1c という 3 つの領域を、5' 末端側では B1, B2, B3 という領域を規定し、これら 6 領域に対して図のように 4 種類のプライマー FIP, BIP, F3, B3 が用いられる。FIP プライマーは標的遺伝子の F2c 領域と相補的な F2 領域を 3' 末端に、5' 末端側に標的遺伝子の F1c 領域と同じ配列を持ち、BIP プライマーは標的遺伝子の B2c 領域と相補的な B2 領域を 3' 末端側に、5' 末端側に標的遺伝子の B1c と同じ配列を持つように設計される。F3 と B3 プライマーはそれぞれ標的遺伝子の F3c と B3c と相補的な領域を持つ。

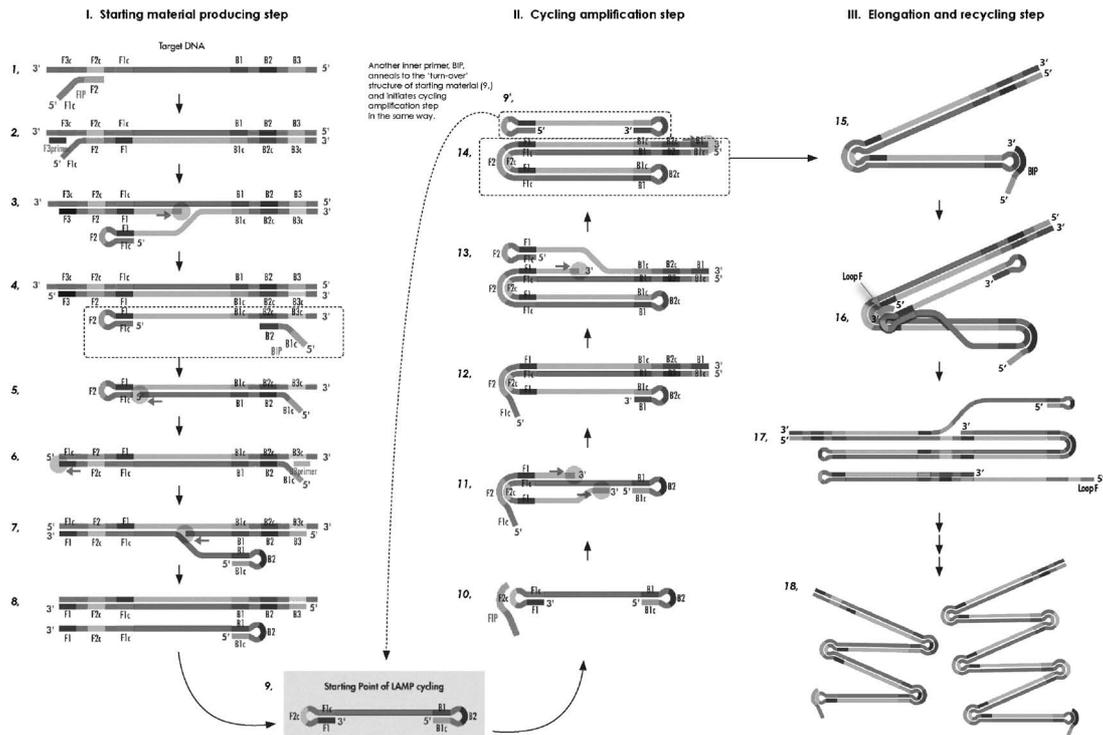


図2 LAMPの反応機構

して、お互いに相補的な配列が交互に繰り返した構造の増幅産物DNAが蓄積する(図2, 18)。そしてその過程で生成された9,9'の構造をもつものがサイクリング反応に加わり、等温で増幅反応が連続的に進む。

LAMP法は、反応条件は簡易であるが、反応機構は少々複雑である。紙面の都合上、詳細な反応機構は栄研化学㈱のホームページ(<http://www.eiken.co.jp>)を参照されたい。ホームページには反応機構の理解のために、LAMP増幅反応のアニメーションを掲載している。

3. LAMP法の特長

LAMP法は他の遺伝子増幅法にない特長を持つ。

(1) 一定温度で増幅反応する

PCR法と異なり、一定温度で1種の酵素のみで実施できるのはLAMP法のみで、しかも特殊な試薬は不要である。LAMP法は60~65℃付近の一定温度で反応を行うため、簡易で安価な装置で試験が可能である。

(2) 高い特異性

LAMP法では、6つの領域、4つのプライマーを必要とし、この6つの領域も順番が規定されるため、増幅の特異性は極めて高い。この特異性を利用して一塩基の違いを区別することが可能で、ヒトの遺伝子の一塩基多型(SNP)タイピング検査も可能である。³⁾

(3) 迅速で感度が高い

LAMP法は標的遺伝子を効率よく増幅し、一時間以内に検出が可能である。感度も数コピー程度から増幅が

でき、PCR法やnested PCR法と同等かそれ以上である。⁴⁻⁶⁾ 図3はレジオネラ属菌検出用LAMPの測定結果である、1テストあたり数個の細胞数で30分以内に増幅を認めている。⁶⁾ また、鎖置換型合成反応を利用しているため、PCR法のように材料由来の阻害も受けにくく、増幅物は0.5 mg/mLと格段に多い。さらに効率を高めるためにループプライマーとよばれるプライマーが開発され、より効率の高い増幅反応が可能となった。⁷⁾

(4) RNAの1ステップ増幅が可能

標的遺伝子がRNAの場合、通常は逆転写酵素でRNAからcDNAを合成した後に増幅反応を行うが、LAMP法の場合は、逆転写酵素を同時に添加することで、DNAの場合と全く同様に増幅が可能であり、SARSコロナウイルスやノロウイルスなどの検出にも応用されている。^{4,5)}

(5) 簡易検出が可能

従来の遺伝子増幅法は増幅反応後、確認のための検出操作が必須であり、これには電気泳動による増幅産物の解析や別途プローブを用いた検出反応が必要など煩雑性を伴っている。LAMP法は原理的に配列を確認しながら増幅を行っているため、特異性が極めて高く、結果を増幅の有無で判定することが可能である。また、増幅物の量も桁外れに多いため、簡単な検出手段を選択することが可能である。例えば、DNAが伸長合成する際に多量に生成する副産物のピロリン酸マグネシウムの白濁・

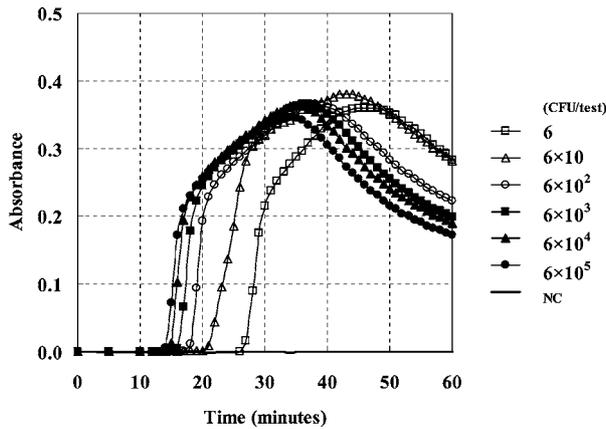


図3 *Legionella pneumophila* 検出用 LAMP 法の増幅結果 (文献 6 より許可を得て掲載)
L. pneumophila ATCC 33152 株の試験菌量が $6 \sim 6 \times 10^5$ colony forming unit (CFU) での LAMP 反応の結果。6 CFU/test の菌量でも 30 分以内に濁度の上昇が見られ、遺伝子増幅の確認が可能である。NC; Negative control。

白沈を指標に肉眼や簡易な測定器で増幅の有無を確認することが可能である (図 4)。さらに、蛍光キレート剤を添加することにより、より明確に判定が可能となる。当然の事ながら、この濁度や蛍光を機器でリアルタイムに測定することも可能である。

4. おわりに

LAMP 法は、2000 年に開発された国産の遺伝子増幅法である。ここで述べたようにその反応機構は複雑であり、プライマー設計も PCR 法と比較して簡単ではないが、出来上がった試薬を使用して検査担当者や研究者が行う操作は単純である。サンプル (標的遺伝子) と試薬を $60 \sim 65^\circ\text{C}$ で 30~60 分インキュベートすることで増幅物あるいは増幅の有無を簡単、迅速に検出することができる方法である。しかも、高い特異性と感度を有しており、特別な器具も必要なく経済的にも優れた遺伝子増幅法といえる。極端な例では温浴槽とピペットがあれば試験が可能であり、また閉鎖系で試験可能なことから増幅産物による実験環境の汚染も回避できる。これまでの遺伝子検査は検査現場というより研究室で実施されているという印象が強いが、LAMP 法は遺伝子検査を検査室で実施するための障害となっていた操作性、経済性、信頼性といった問題点を解消した技術といえる。魚病分野ではコイヘルペスの試薬開発により養魚場の検査室での遺伝子診断が可能となり、他のウイルス疾患や冷水病のような分離が困難な細菌による感染症の検出試薬の開発も要望されている。現在 Foundation for Innovative New Diagnostics と共同で途上国に適した簡便な結核菌

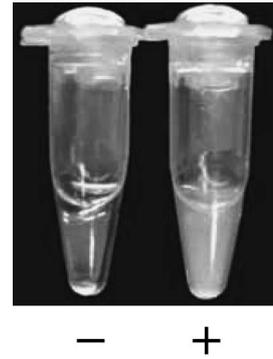


図 4 LAMP 反応後の白濁 (*Legionella pneumophila* 検出反応の例)

DNA 合成の際に、dNTPs から遊離されるピロリン酸イオンがマグネシウムイオンと結合し不溶性のピロリン酸マグネシウムが副産物として生成される。増幅効率の高い LAMP 法では肉眼で確認可能なほど多量に生成される。

検出の LAMP 法システムを開発中であるが、この技術開発でより簡易な設備で遺伝子検査が可能になることが期待される。LAMP 法の応用研究はまだ始まったばかりであり、今後広い範囲での検査法、研究方法として応用されることを期待している。

文 献

- 1) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; **230**: 1350-1354.
- 2) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 2000; **12**: e63.
- 3) Iwasaki M, Yonekawa T, Otsuka K, Suzuki W, Nagmine K, Hase T, Horigome T, Notomi T, Kanda H. Validation of the loop-mediated isothermal amplification method for single nucleotide polymorphism genotyping with whole blood. *Genome Letters* 2003; **2**: 119-126.
- 4) Thai HTC, Le MQ, Vuoug CD, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a novel-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 2004; **42**: 1956-1961.
- 5) Fukuda S, Takao S, Kuwayama M, Shimazu Y, Miyazaki K. Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-Loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 2006; **44**: 1376-1381.
- 6) 安中敏光, 小島 禎, 池戸正成, 古畑勝則. LAMP 法による環境水からの *Legionella* 属菌の検出. 防菌防黴 2004; **32**: 195-201.
- 7) Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primer. *Molecular and Cellular Probes* 2002; **16**: 223-229.