

[総 説]

新規遺伝子増幅法：LAMP 法

池戸正成

栄研化学株式会社 生物化学研究所

(平成 17 年 2 月 21 日受付)

臨床微生物分野における遺伝子診断法は、PCR 法の開発により迅速検査法として普及してきた。しかし、試薬や資材は高価であり、検査手技も煩雑な点が多く臨床検査室での実施にはまだ障害がある。2000 年に開発された LAMP 法は、約 65°C の等温で、1 種の合成酵素のみで試験可能な方法で、増幅反応は数十分で確認できるという長所をもった遺伝子増幅法である。このように迅速で簡易な特長を有した LAMP 法は、臨床検査の現場での遺伝子診断の実施が一段と現実化する可能性をもった試験法である。ここでは、その概要の紹介を行う。

Key words: LAMP 法, 遺伝子増幅法

はじめに

20 年前 Polymerase chain reaction (PCR) による遺伝子増幅法が Kary B. Mullis ら¹⁾により考え出されて以来、分子生物学分野の研究は目覚ましい発展を遂げてきた。医学の領域では、疾患の病態が分子・遺伝子レベルで解明されるようになり正確な診断や治療法が開発されてきている。感染症領域では起因菌の特異遺伝子を短時間で増幅させ、確認することで迅速診断が可能となってきた。特に、ウイルスあるいは結核菌のように人工培地で発育できない、あるいは発育が極めて遅い微生物の検出には非常に有用な方法である。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二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→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。したがって、温度コントロール装置(サーマルサイクラー)が必要であり、反応の確認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検査全体の煩雑性を伴い、臨床検査現場で実施困難なのが現状である。

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) は、上述の PCR 法の問題点を解決すべく、等温かつ、1 種類の合成酵素のみで増幅反応が起こり、さらに診断技術として特に重要視される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⁾。

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の設計を工夫し、等温かつ、1 種類の酵素での増幅反応を達成している。

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 法は六つの領域を含む 4 種類のプライマー(図 1)を用いて増幅反応を行う。これら、4 種類のプライマーと鎖置換型の DNA polymerase、標的とした DNA を混合して 65°C 等温で反応させる。この 65°C 付近では、2 本鎖 DNA は動的平衡状態にあるため、いずれかのプライマーが 2 本鎖 DNA の相補的な領域にアニールし、伸長することで片側の鎖がはがされ、1 本鎖状態になる。増幅機構は 1 本鎖状態になった鋳型に FIP プライマーがアニールするところ(図 2 中(以下同じ)、(1)から説明する。

I. 起点構造物の生成

- a) 鎖置換型 DNA ポリメラーゼの働きにより、FIP プライマーの F2 領域の 3' 末端を起点として鋳型 DNA と相補的な DNA 鎖が合成され、FIP プライマーの外側に F3 プライマーが

著者連絡先: (〒329-0114) 栃木県下都賀郡野木町野木 143
 栄研化学株式会社 生物化学研究所
 池戸正成
 TEL: 0280-57-0713
 FAX: 0280-57-0712
 E-mail: masanari_ikedo@eiken.co.jp

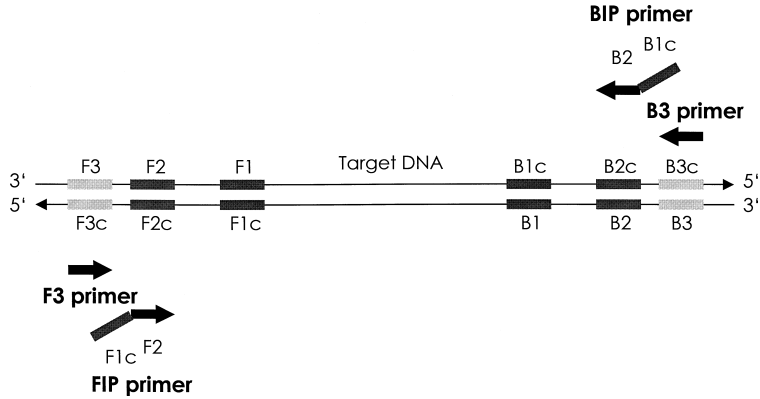


図1 標的遺伝子と LAMP プライマーの構造

標的遺伝子の 3' 末端側から F3c, F2c, F1c という三つの領域を、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 領域と同じ配列をもち、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 と同じ配列をも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 と相補的な領域をもつ。

- アニールする (2)。
- b) F3 プライマーがアニールした 3' 末端を起点として鎖置換型 DNA ポリメラーゼの働きにより、先に合成されている FIP プライマーからの DNA 鎖をはがしながら DNA 合成が伸長していく (3)。
 - c) F3 プライマーから合成された DNA 鎖と鋳型 DNA が 2 本鎖となる (4)。
 - d) FIP プライマーから先に合成された DNA 鎖は、F3 プライマーからの DNA 鎖によってはがされて 1 本鎖 DNA となるが、この DNA 鎖は、5' 末端側に相補的な F1c, F1 をもち、自己アニールを起こしてループを形成する (3, 4)。
 - e) 上記 d) の DNA 鎖に対し、BIP プライマーがアニールする (4)。この BIP プライマーの 3' 末端を起点として相補的な DNA 合成が行われる (5)。この過程では形成されたループははがされて伸びる。さらに、BIP プライマーの外側に、B3 プライマーがアニールする (6)。その 3' 末端を起点として鎖置換型 DNA ポリメラーゼにより先に合成されている BIP からの DNA 鎖をはがしながら DNA 合成が伸長していく (7)。
 - f) 上記 e) の過程で 2 本鎖 DNA ができる (8)。
 - g) e) の過程ではがされた BIP プライマーから合成された DNA 鎖は両端に相補的な配列をもつため、自己アニールし、両端にループを形成しダンベル型の構造になる。この構造が LAMP 法における増幅サイクルの起点構造となる。すなわち、ここまでは LAMP 法における起点構造を作るための過程である (9)。
- ## II. LAMP 増幅サイクル
- g) (9) にあるダンベル型構造 DNA 鎖の 3' 末端側のループ部分 (F2c 領域) は 1 本鎖なので、FIP プライマーがアニールすることができる (10)。
 - i) ダンベル型構造 DNA 鎖の 3' 末端の F1 領域を起点として、自己を鋳型として DNA 合成が伸長するが (11), h) の FIP プライマーから起点として伸長してくる DNA 鎖にはがされ 1 本鎖となる。この 3' 末端は相補的な領域をもつため、それらがアニールしループを形成する (12)。
 - j) このループの 3' 末端 (B1 領域) から自己を鋳型として DNA 合成が始まり、FIP プライマーからの 2 本鎖となった部分をはがしながら伸長し (13), (14) の構造となる。この過程ではがされた 1 本鎖の DNA 鎖の両端はそれぞれ相補的な領域、F1 と F1c, B1c と B1 をもつため自己アニールしてダンベル型の構造をとる (9')。この構造は (9) の裏返しとなっている。
 - k) この (9') の構造は、(9) と同様に 3' 末端 (B1 領域) を起点として、自己を鋳型として DNA 合成が伸長し、また 1 本鎖となっている B2c

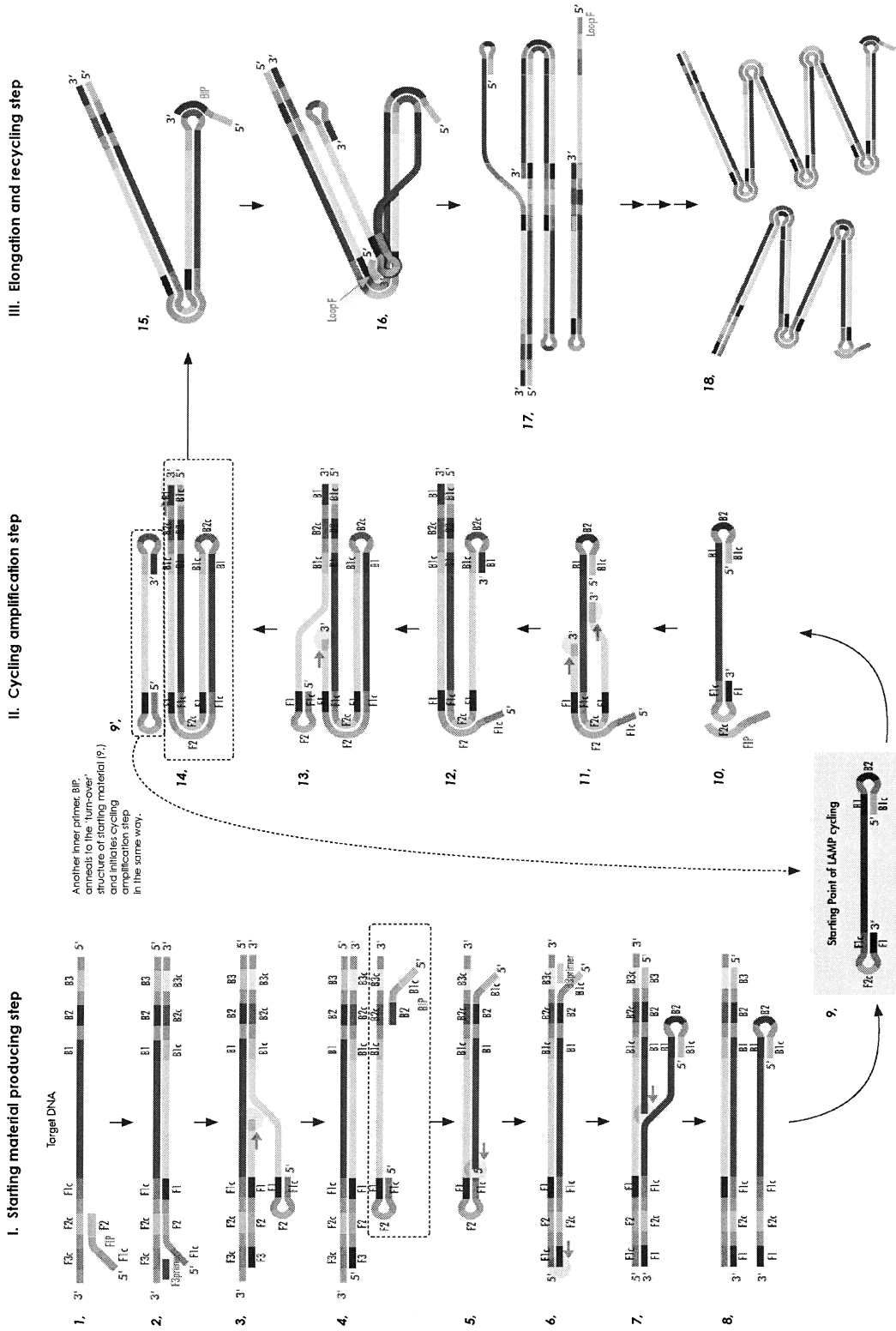


図2 LAMP の反応機構

領域に BIP プライマーがアニールして、B1 領域からの DNA 鎖をはがしながら合成が行われる。それにより、(10)~(14) の過程を経て再び (9) の構造ができる。

III. 合成伸長と再サイクル

- 1) (14) の構造からは、1 本鎖となっている B2c 領域に BIP プライマーがアニールして、2 本鎖の DNA をはがしながら DNA 鎖が合成される。この過程の結果、同一鎖状に互いに相補的な配列が繰り返す構造が、いろいろなサイズで生成される (15~18)。

LAMP 法は、非常に簡易な系であるが、反応機構は少々複雑である。栄研化学 (株) ホームページ内ゲノムサイト (<http://loopamp.eiken.co.jp/>) 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ので参照されたい。

LAMP 法用プライマーの設計方法

標的遺伝子について図 1 に示すとおり 3' 末端側から F3c, F2c, F1c という三つの領域を、5' 末端側では B1, B2, B3 という領域を規定し。これら 6 領域に対して次のように 4 種類のプライマー FIP, BIP, F3, B3 を設計する。

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' 末端にもち、5' 末端側に標的遺伝子の F1c 領域と同じ配列をもつように設計する。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' 末端側にもち、5' 末端側に標的遺伝子の B1c と同じ配列をもつように設計する。F3 と B3 プライマーはそれぞれ標的遺伝子の F3c と B3c と相補的な領域をもつように設計する。

最適なプライマー設計が LAMP 法による増幅には必要不可欠な条件であるが、PCR 法のプライマー設計より複雑であるため、プライマー設計の支援ソフトウェアを利用するのが便利である。また、設計のポイントとして、次のようなことが挙げられる。

- 3' 末端が極端に AT rich にならないようにする
- 増幅領域は F2 と B2 の間で 200 bp 以内とする
- F2 あるいは B2 を含むループになる部分のサイズは 30~60 bp とする
- 標的遺伝子の存在を検出する目的であれば、F1~B1 の間の領域はなくてもよい

なお、LAMP 法に用いるプライマーの設計には支援ソフトウェアが栄研化学(株)ホームページ内ゲノムサイト (<http://loopamp.eiken.co.jp/>) に公開されているので、その利用が便利である。

LAMP 法の特長

LAMP 法は PCR 法など他の遺伝子増幅法にない特長を有している。

1. 一定温度で増幅反応する

PCR 法と異なり一定温度で増幅可能な方法の報告はあるが、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°C 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。また、試薬組成中のベタインなどの効果により、あらかじめ 2 本鎖 DNA の変性を行わなくても反応を開始することが可能である。

2. 高い特異性

LAMP 法では原理で述べたように、六つの領域、四つのプライマーを必要とし、この六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。このことにより、増幅の有無により標的遺伝子が存在したか否か、つまり目的とした細菌やウイルスの存在の有無

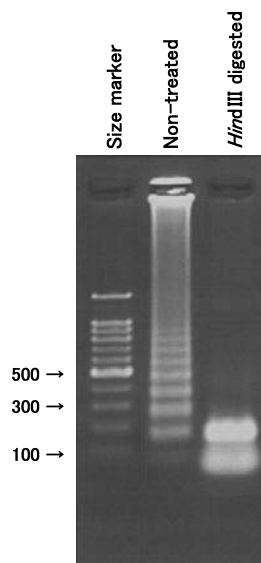


図 3 LAMP 産物の制限酵素処理による特異性の確認

Verotoxin (VT) 1 検出用 LAMP 反応で得られた増幅産物 (中央) と、それを制限酵素 *Hind*III で消化したもののアガロースゲル電気泳動像 (右)。LAMP 反応では標的遺伝子は同一鎖状に互いに相補的な配列が繰り返す構造がいろいろなサイズで合成されるため、泳動像は中央のレーンのようにラダー状のパターンになる。VT1 の増幅産物は *Hind*III により、約 190 bp と 46 bp のサイズに消化されることが、泳動像で確認できる。

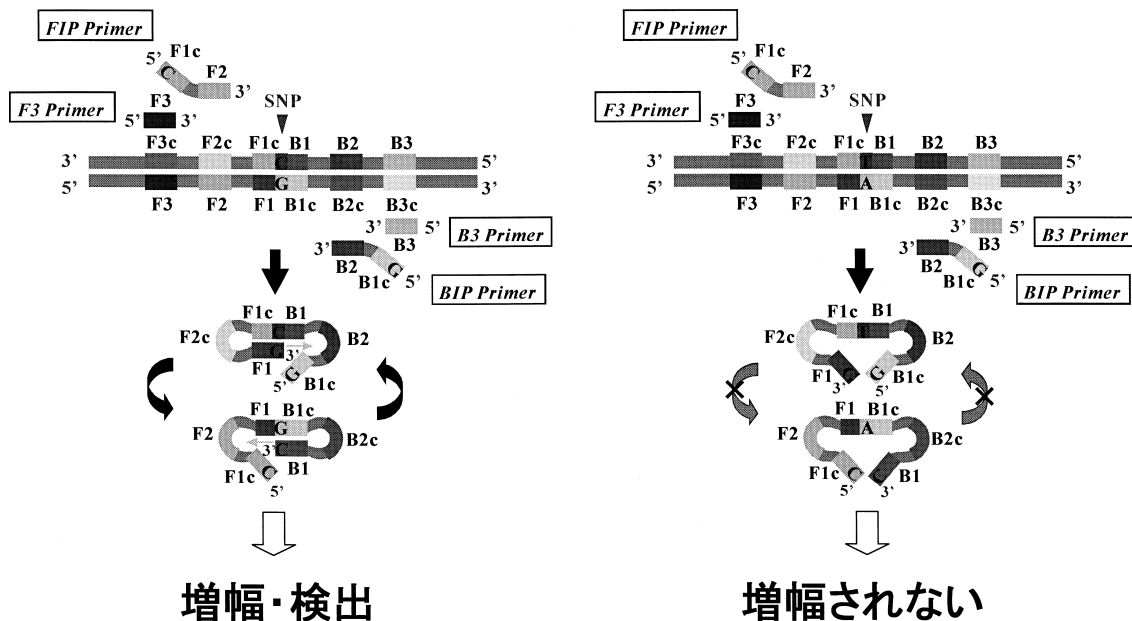


図 4 SNP タイピングの原理

プライマーの FIP および BIP の 5' 末端に SNP（ここでは wild type (WT) allele）の一塩基がくるように設計されたプライマーを用いることでタイピングを行う。WT 用プライマーを用いることで標的遺伝子が WT allele の場合、LAMP 法の起点構造であるダンベル構造から DNA の合成反応が起こり、増幅反応が連続的に進行する（左）が、MUT allele の場合、ダンベル構造からの DNA 合成が起こらず、増幅反応は進行しない（右）。

の判定が可能である。図 3 は腸管出血性大腸菌のベロ毒素 (VT1) の増幅物をアガロースゲルで電気泳動下結果である。左のレーンは増幅産物そのまま、LAMP 反応では標的遺伝子の相補的な配列が繰り返しされた構造がいろいろなサイズで生成されるため、写真のようなラダー状の電気泳動像になる。右のレーンは増幅産物を制限酵素 (*Hind*III) で消化したものであり、バンドが集約され、さらにこの消化物の配列を確認した結果、標的遺伝子と同じ配列であった。

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、ヒトの遺伝子を用いた検査も可能である³⁾。ヒトの薬剤代謝関連遺伝子であるチトクローム P450 CYP2C19 遺伝子は代謝能の変化を示す一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) の存在が明らかとなっている。この遺伝子の Wild type (WT) allele と Mutant (MUT) allele は一塩基の違いで区別が可能であり、対象となる塩基はそれぞれ guanine (G) と adenine (A) である。プライマーの FIP および BIP の 5' 末端に SNP（ここでは WT allele）の一塩基がくるように設計されたプライマーを用いることでタイピングが可能である。この WT 用プライマーを

用いることで標的遺伝子が WT allele の場合、LAMP 法の起点構造であるダンベル構造から DNA の合成反応が起こり、増幅反応が連続的に進行する（図 4 左）。反対に標的遺伝子が MUT allele の場合、ダンベル構造からの DNA 合成が起こらず、増幅反応は進行しない。誤って合成反応が起こったとしても、繰り返し同じ箇所のチェックを受けるため、反応は停止あるいは著しく遅延することから（図 4 右）、この検査結果から薬物治療の用量調整に関する情報を得ることができる。

3. 迅速で感度が高い

LAMP 法は特異性が高いことから、標的遺伝子を効率よく増幅し、1 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 nested PCR 法と同等かそれ以上である^{4)~7)}。図 5 は *Legionella pneumophila* の検出用 LAMP の測定結果である、1 テスト当たり数個の菌量で 30 分以内に増幅を認めている⁷⁾。また、鎖置換型合成反応を利用しているため、PCR 法のような精製物による阻害も受けにくく、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呼ば

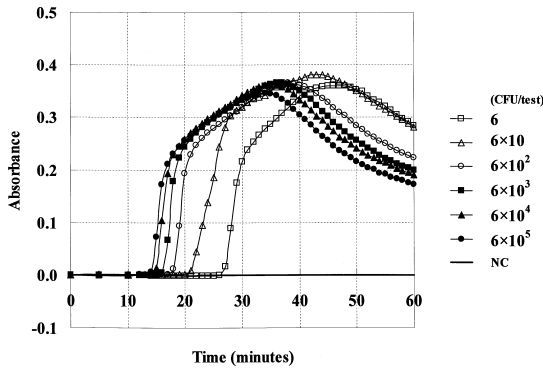


図5 *Legionella pneumophila* 検出用 LAMP 法の増幅結果 (文献 7 より引用)
L. pneumophila ATCC 33152 株の試験菌量が $6 \sim 6 \times 10^5$ colony forming unit (CFU) での LAMP 反応の結果, 6 CFU/test の菌量でも 30 分以内に濁度の上昇が見られ, 遺伝子増幅の確認が可能である (NC, negative control)。

れるプライマーが開発された⁸⁾。前述したように基本的な四つのプライマーによる LAMP 反応では生成された相補的なダンベル様構造物の 5' 末端側のループの 1 本鎖部分 (F1 領域と F2 領域の間, あるいは B1 領域と B2 領域の間) は鋳型として利用されないため, 相補的な配列をもつループプライマーを用いることで DNA 合成の基点を増やすことができ, より効率の高い増幅反応が可能となった (図 6)。

4. RNA の 1 ステップ増幅が可能

標的遺伝子が RNA の場合, 通常はまず逆転写酵素で 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しておくことで, DNA の場合と全く同様に増幅が可能であり, SARS コロナウイルスなどの検出にも応用されている^{5), 6)}。

5. 簡易検出が可能

従来の遺伝子増幅法は増幅反応後, 確認のための検出反応が必須であり, これにはアガロースゲルでの電

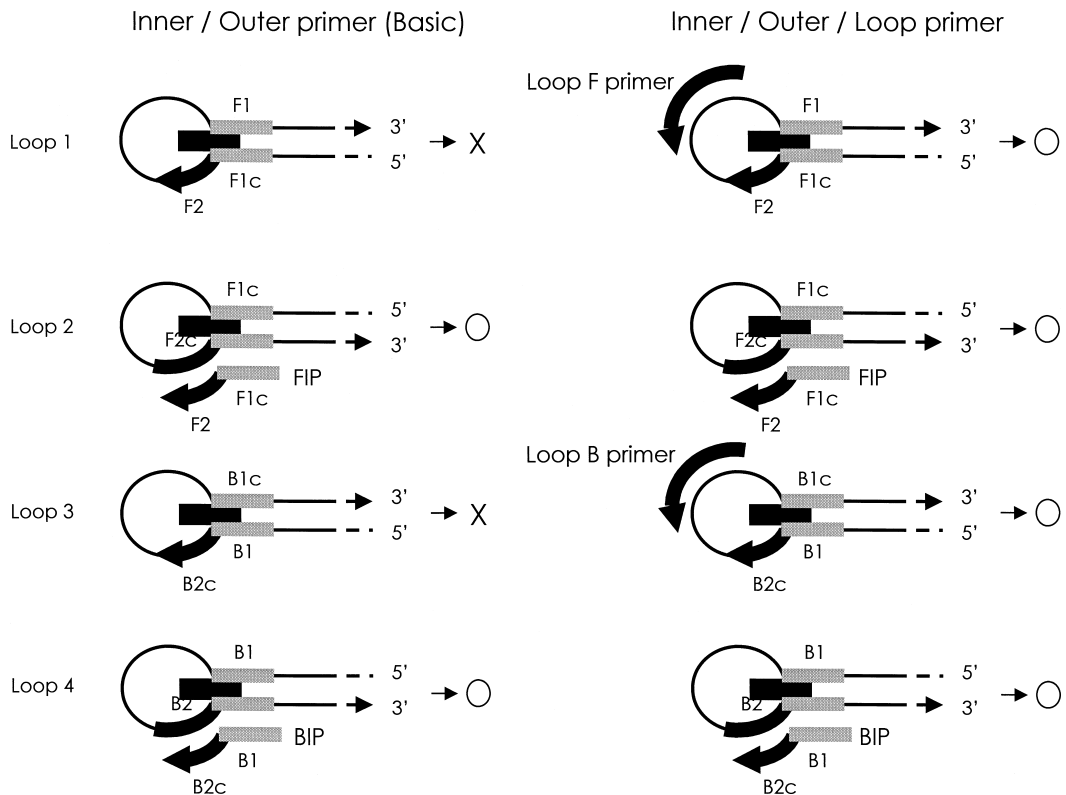


図 6 ループプライマーの効果

通常の四つのプライマーでの LAMP 反応では, FIP あるいは BIP プライマーがアニールできない 1 本鎖のループが形成される (左), この部分にアニールできるプライマー (Loop F, Loop B) を追加することで図右のようにより効率よく増幅反応が進行する。

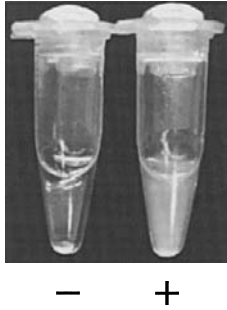


図 7 LAMP 反応後の白濁

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 (*Legionella pneumophila* の例)。

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検査全体の煩雑性を伴い、臨床検査現場で実施を困難にしている。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、前述したように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、エチジウムブロマイドのような 2 本鎖核酸に結合する蛍光インターカレーターを試薬に添加しておくことで、反応の有無を紫外線ランプ下で目視で確認することができる⁹⁾。また、DNA が伸長合成する際に、基質 (dNTPs) から遊離されるピロリン酸イオンが反応溶液中のマグネシウムイオンと結合しピロリン酸マグネシウムが副産物として生成されるが、増幅効率の高い LAMP 法では多量に生成し、白濁・白沈が生じてくる (図 7)。これ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も可能である¹⁰⁾。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。当然のことながら、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。

このような判定法は、増幅反応後のチューブを開栓することなく実施できるため、実験環境を核酸で汚染する危険性が極めて少なくなる利点もある。

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原理は複雑であり、プライマー設計も PCR 法と比較して簡単ではな

いが、できあ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 60~65°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易、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臨床検査室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。LAMP 法の臨床微生物分野で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。

引用文献

- 1) Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, et al. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- 2) Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, et al. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl. Acids Res.* 12: e63.
- 3) Iwasaki, M., T. Yonekawa, K. Otsuka, et al. 2003. Validation of the loop-mediated isothermal amplification method for single nucleotide polymorphism genotyping with whole blood. *Genome Lett.* 2: 119-126.
- 4) Enosawa, M., S. Kageyama, K. Sawai, et al. 2003. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4359-4365.
- 5) Parida, M., G. Posadas, S. Inoue, et al. 2004. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 42: 257-263.
- 6) Thai, H. T. C., M. Q. Le, C. D. Vuong, et al. 2004. Development and evaluation of a novel-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1956-1961.
- 7) 安中敏光, 小島 禎, 池戸正成, 古畑勝則. 2004. LAMP 法による環境水からの *Legionella* 属菌の検出. *防菌防黴* 32: 195-201.

- 8) Nagamine, K., T. Hase, T. Notomi. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primer. *Molec. Cell. Probes* 16: 223-229.
- 9) 富田憲弘, 神田秀俊, 森 安義, 他. 2000. 蛍光インターカレーターを用いた LAMP 産物の簡易検出法. *生化学* 72: 1094.
- 10) Mori, Y. K. Nagamine, N. Tomita, T. Notomi. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 1250-1254.

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method: A Novel Nucleic Acid Amplification Method

Masanari Ikedo

Biochemical Research Laboratory, Eiken Chemical Co., Ltd.

A novel DNA amplification method, the loop mediated isothermal amplification (LAMP) method was established in 2000. This method has the characteristic of high specificity, sensitivity, rapidity and simple procedure. Polymerase chain reaction (PCR) method is generally used as a rapid diagnosis procedure in the field of clinical microbiology. But, it needs the expensive reagents and instruments, and high-level knowledge and technique to the personnel for operation, so it would be difficult to use in the clinical laboratory. The LAMP is able to perform under isothermal condition with simple procedure and to obtain the results in less than one hour without particular instrument. Because of these advantages, the LAMP method would be use in clinical laboratory as a practical method for diagnosis of infectious diseases.