

LAMP法の原理

—遺伝子の簡易・迅速な増幅法—

牛久保 宏

栄研化学株式会社 マーケティング統括部遺伝子検査チーム

遺伝子検査は感染症診断をはじめとして、さまざまな分野で利用されている。しかし、実際の検査に十分に広く普及しているとはいえない。これは煩雑な操作、高コストが主な要因となっている。我々は、従来の遺伝子増幅法代わる簡易、迅速な増幅法としてLAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法¹⁾を開発した。LAMP法には①全ての反応が等温で進行する、②増幅効率が極めて高く、大量の増幅産物を得ることができる、③極めて高い特異性を持つなどの特徴を有す。また、標準の増幅時間は1時間であるが、新たなループプライマーを追加する迅速法により、30分以内の増幅が可能となった²⁾。更に、検出においては、増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウムの白濁を目視で確認することにより、検出のための試薬・機器を使用せずに標的遺伝子の有無を判定することもできる。これらの特長を組み合わせることで、LAMP法は臨床現場での遺伝子検査、あるいは食品、環境分野での迅速検査が実現可能であり、その他様々な領域での遺伝子検査に展開できるものと考えられる。

はじめに

遺伝子検査は、大きく分けて核酸の抽出、遺伝子の増幅、検出の3工程に分けられる。遺伝子検査では検体に含まれる目的の遺伝子量が極めてわずかなため遺伝子を検出するためには、まず遺伝子を増幅しなければならない。従って、遺伝子検査を実施する上で最も重要なポイントは、遺伝子増幅である。

今回、新規遺伝子増幅法LAMP法の原理について紹介する。

従来の遺伝子増幅法

PCR法は現在最も広く普及し利用されている遺伝子増幅法である。しかし、反応には温度を段階的に調整する装置が必要であり、増幅産物の確認にはゲル電気泳動や、別途プローブなどを用いた検出反応を行わなければならない。現在、PCR法は広範な分野で用いられ、不可欠な技術である反面、工程が多く操作が煩雑であるという問題がある。

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法の原理

我々は、等温かつ1種類の合成酵素のみで増幅反応が起り、さらに診断技術としてとくに重要視される特異性の高い新しい遺伝子増幅法を開発した。

LAMP法の原理を、用いる試薬、LAMP法専用プライマーの設計方法、増幅メカニズムの順に解説する。

1. LAMP法に用いる試薬

LAMP法は、DNAを増幅する方法である。但し、逆転写酵素を用い1ステップでRNAからも増幅することができる。

DNAから増幅する場合は、4種類のプライマー (FIP [Forward Inner Primer], F3プライマー, BIP [Backward Inner Primer], B3プライマー)、鎖置換型DNAポリメラーゼ、基質 (dNTPs) と反応バッファーを必要とする。

RNAから増幅する場合は、DNAの場合の試薬に逆転写酵素を追加するのみである。表1にB型肝炎ウイルス (HBV) を例とした試薬およびその濃度を示す。

2. LAMP法専用プライマーの設計方法

まず、標的遺伝子について、図1に示すように増幅したい領域から3'側に向かってF1c, F2c, F3c, 5'側に

連絡先

〒130-0026 東京都墨田区両国1-12-8 ムネカワビル
E-mail: lamo@eiken.co.jp
http://loopamp.eiken.co.jp/

表1 LAMP法の試薬と濃度(標的遺伝子:HBV)

4 U/ μ L <i>Bst</i> DNA polymerase (New England Biolabs)	8 U/tube
10 \times Thermopol Buffer (New England Biolabs)	1 \times (MgSO ₄ 2 mM)
100mM MgSO ₄	2 mM
10mM dNTPs	400 μ M
4 M betaine (Sigma)	1.0M
プライマー:FIP	40pmol/tube
プライマー:BIP	40pmol/tube
プライマー:F3プライマー	5 pmol/tube
プライマー:B3プライマー	5 pmol/tube
蒸留水	

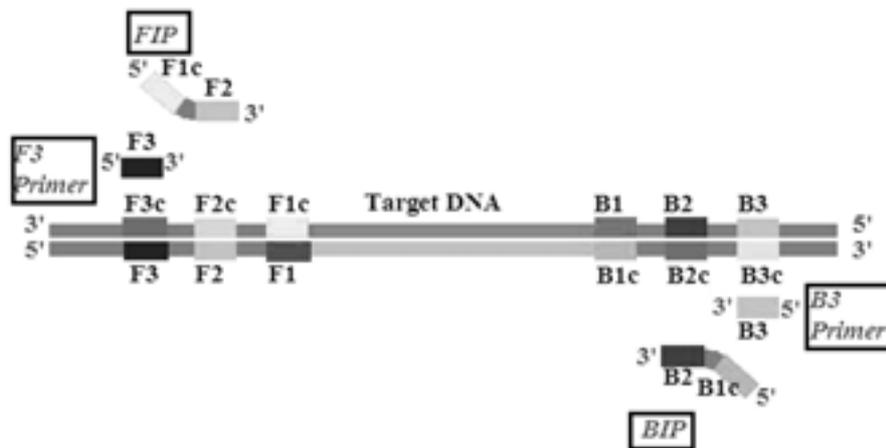


図1 LAMPプライマーの構造

向かってB1, B2, B3という領域を規定し, この6領域に対し, 4種類のプライマーFIP, F3プライマー, BIP, B3プライマーを設計する。

FIPは, 標的遺伝子のF2c領域と相補的なF2領域を3'末端側に持ち, 5'末端側に標的遺伝子のF1c領域と同じ配列を持つように設計する。F3プライマーは, 標的遺伝子のF3c領域と相補的なF3領域を持つように設計する。BIPは, 標的遺伝子のB2c領域と相補的なB2領域を3'末端側に持ち, 5'末端側に標的遺伝子のB1c領域と同じ配列を持つように設計する。B3プライマーは, 標的遺伝子のB3c領域と相補的なB3領域を持つように設計する。

LAMP法を成功させるポイントは, このプライマー設計にある。表2に設計上のポイントを示す。

なお, LAMP法専用プライマー設計について, 富士通株式会社と共同開発した設計支援ソフトをWeb上で公開しているので, 活用されたい(<http://venus.netlaboratory.com/partner/lamp>)。

3. LAMP法の増幅メカニズム

前述した試薬, 設計したプライマー及び増幅したい標的遺伝子を含むサンプルを一緒にし, 一定温度(60~65℃)

でインキュベーションすると, 以下の反応(a~d)が進む。なお, 2本鎖DNAは65℃付近では動的平衡状態にあると考えられるため, 1本鎖部分が生じていずれかのプライマーが相補的な箇所アニールし, 伸長することで片側の鎖がはがされ, 1本鎖状態になる。そのため, LAMP法ではPCR法のようにあらかじめ2本鎖DNAを1本鎖に熱変性する過程を必要としない。図2, 3に示す増幅メカニズムは, 1本鎖状態になった鋳型にFIPがアニールするところから説明する。

a) 鎖置換型DNAポリメラーゼの働きにより, FIPのF2領域の3'末端を起点として鋳型DNAと相補的なDNA鎖が合成される(図2(1), (2))。

b) FIPの外側に, F3プライマーがアニールし, その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って, 先に合成されているFIPからのDNA鎖を剥がしながらDNA合成が伸長する。F3プライマーから合成されたDNA鎖と鋳型DNAが2本鎖となるが, FIPから先に合成されたDNA鎖は, F3プライマーからの伸長反応によって剥がされて1本鎖DNAとなる。このDNA鎖は, 5'末端側に相補的な領域F1c, F1を持ち, 自己アニールを起こし, ループを形成する(図2(3), (4), (5), (6))。

表2 プライマー設計上のポイント

①T _m 値推算式	Nearest-Neighbor 法 (オリゴ濃度; 0.1 μ M, イオン濃度; Na+50mM・Mg ²⁺ + 4 mM)
②末端安定性	F2/B2 ; 3'末端, F1c/B1c ; 5'末端, F3/B3 ; 3'末端, LoopF/LoopB ; 3'末端 それぞれの自由エネルギー (dG) に関して dG \leq -4 kcal/mol を満たすこと.
③T _m 値	F1c/B1c ; 64~66 $^{\circ}$ C, F2/B2 ; 59~61 $^{\circ}$ C, F3/B3 ; 59~61 $^{\circ}$ C, LoopF/LoopB ; 64~66 $^{\circ}$ C
④GC content	40~65%
⑤増幅領域	F2の外側からB2の外側までは, 120~160塩基 F25'からF15'までは, 40~60塩基 F3からF2までは, 18~60塩基
⑥二次構造	極端に二次構造をとらないようにする 3'末端が相補的にならないようにする

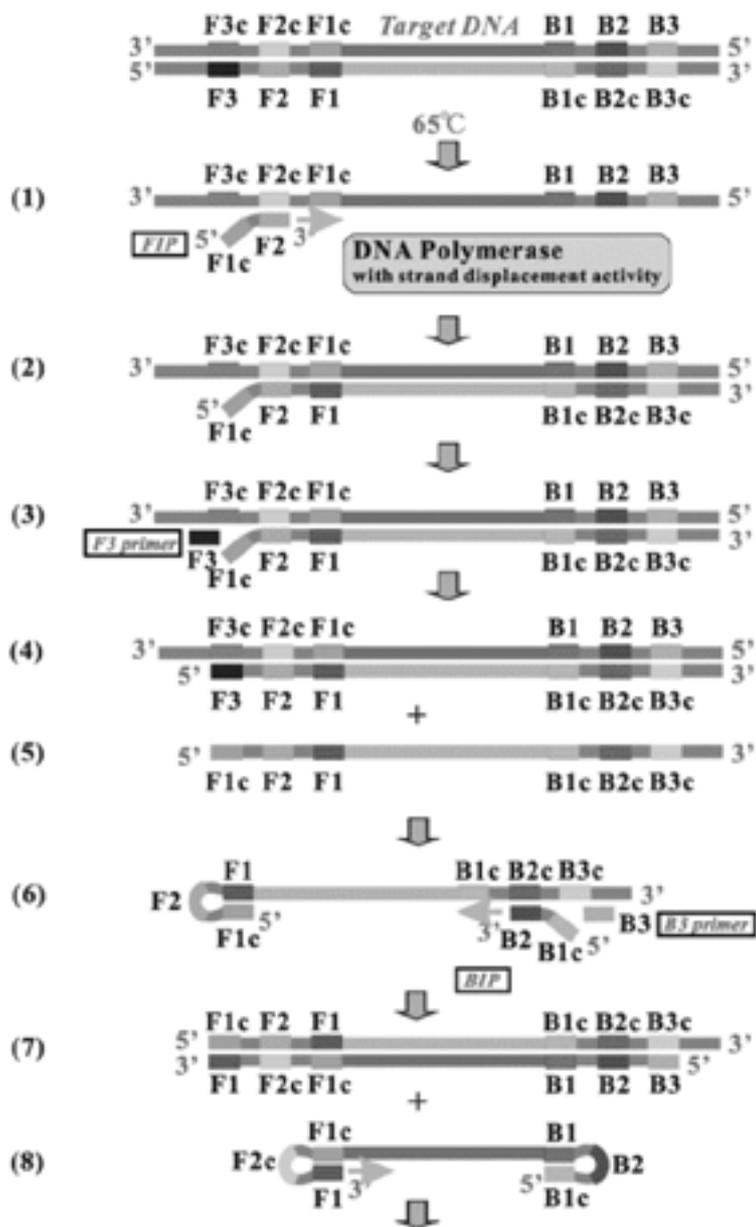


図2 LAMP法の原理(1): LAMP法の初期反応(反応開始~起点構造ができるまで)

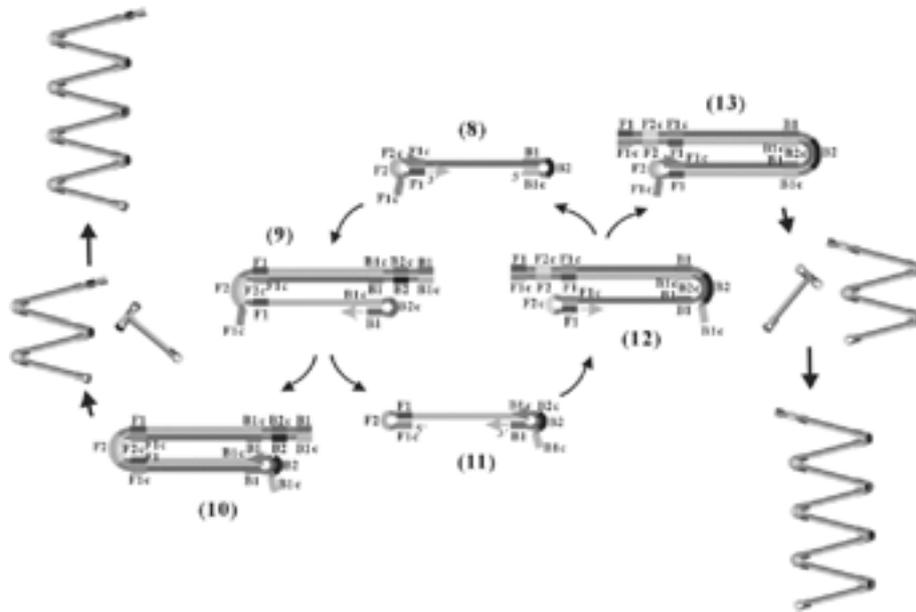


図3 LAMP法の原理(2): LAMP法の増幅サイクル

c) 次に、BIPがアニールし、その3'末端を起点として相補的なDNAの合成が行われる。この時、ループは剥がされて伸びた状態になる。更に、BIPの外側に、B3プライマーがアニールする。そして、その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って、先に合成されているBIPからのDNA鎖を剥がしながらDNA合成が伸長する。B3プライマーから合成されたDNA鎖と鋳型DNAが2本鎖となるが、剥がされたDNA鎖は両端に相補的な領域F1、F1c及びB1、B1cを持つため、自己アニールし、ループを形成しダンベル型の構造となる。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。これまでの過程はLAMP法における増幅サイクルの起点構造を作るための過程である(図2(6),(7),(8))。

d) 増幅サイクルの起点構造で、F1領域の3'末端を起点として、自己を鋳型としてDNA合成が伸長する。この時5'末端側のループは剥がされて伸びた状態になる。更に、3'末端側のループのF2c領域は1本鎖であるため、FIPがアニールすることができ、そのF2領域の3'末端を起点として、F1領域を起点として先に合成されているDNA鎖を剥がしながらDNA合成が伸長する。次に(図3(9))において、F1領域から伸長したDNA鎖は、FIPからの伸長合成によって剥がされ1本鎖となるが、その3'末端側に相補的な領域を持つのでループを形成する。このループのB1領域の3'末端から1本鎖となった自己を鋳型としてDNA合成が始まる。そして、そのDNA鎖が2本鎖部分となっているFIPからのDNA鎖を剥がしながら伸長し(図3(10))の構造となる。上記過程によってFIPから合成されたDNA鎖が剥がされ1本鎖となるが、その両端は、それぞれ相補的な領域F1、F1c及びB1c、B

1を持ち、自己アニールしてループを形成する。この(図3(11))の構造は、先ほどの(図3(8))の構造の裏返しの構造となる。一方、(図3(10))の構造において、1本鎖となっているB2c領域にBIPがアニールして2本鎖の箇所を剥がしながらDNA鎖が合成される。この過程の結果、同一鎖上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(図3)。

なお、LAMP法の増幅メカニズムは多少複雑なので、栄研化学株式会社のゲノムサイトにある動画(<http://loopamp.eiken.co.jp/j/tech/commentary/anim.html>)を参照されたい。

LAMP法の特徴

LAMP法は、従来の遺伝子増幅法にない特徴を有している。

1. 一定温度で増幅反応が進行

LAMP反応は、鎖置換型DNAポリメラーゼにより60~65℃付近の一定の反応温度で行い、ベタインなどの核酸2重鎖を不安定にする試薬の効果もあり、2本鎖DNAの変性をあらかじめ行わなくとも反応を開始することができる⁵⁾。したがって、精密な温度制御装置は必要とせず、温度を一定に保てる装置があれば増幅可能である。なお、一定温度で増幅可能な方法は、他にもいくつかあるが^{5,6)}、1つの酵素のみで出来るのはLAMP法だけである。

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、更にこの6つの領域は設計通りに並んでいなければ

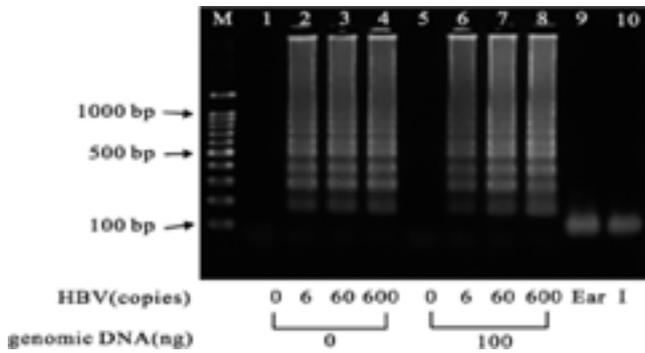


図4 LAMP法による増幅産物の電気泳動像と検出感度（標的遺伝子：HBV plasmid DNA）

ヒトゲノムDNA100ngの有無による60℃、60分間の増幅での検出感度を示す。Mは100bp毎のサイズマーカー、レーン1～4はヒトゲノムDNAなしでLAMPを実施。レーン5～8ヒトゲノムDNA 100ng存在下でLAMPを実施。レーン1と5はHBV plasmid DNAなしでLAMPを実施。レーン2と6はHBV plasmid DNA 6コピーで実施。レーン3と7はHBV plasmid DNA60コピーで実施。レーン4と8はHBV plasmid DNA600コピーで実施。レーン9と10はそれぞれレーン2と6と同じ増幅産物をEar I（1/5容量）で消化。

増幅できない。そのため、原理的に増幅の特異性は極めて高く、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が判定できる。

図4に示すとおり、ゲノムDNA100ng存在下でも6コピーからの増幅が可能で、標的遺伝子が存在しない場合は増幅しなかった。また、LAMP法では標的遺伝子の相補的な配列が繰り返された構造がいろいろなサイズできるため図4に示すような特徴的な電気泳動像になる。この増幅産物を制限酵素によって消化するとバンドは集約し、また、これらのバンドの塩基配列を確認した結果、全て標的遺伝子配列であった。

3. 迅速、高い増幅効率（高感度）

LAMP法は、その増幅原理からプロダクトインヒビションが起こらず、標的遺伝子のみを効率よく増幅し、通常1時間以内に検出可能である。ほとんどのターゲットで初期鋳型量10コピー程度から増幅が可能である。

LAMP増幅反応はもともと迅速であるが、反応速度を、更に短縮することが可能である。ダンベル構造の5'末端側にあるループの1本鎖部分（B1領域とB2領域の間、あるいはF1領域とF2領域の間）に相補的な配列を持つループプライマー（それぞれループプライマーB、ループプライマーF）を用いることによりDNA合成の起点を増やすことが可能²⁾、これにより、従来利用されていなかったループ部分も利用され、増幅効率は飛躍的に増大する。これにより、ほとんどの標的遺伝子で15～60分での検出が可能となった。

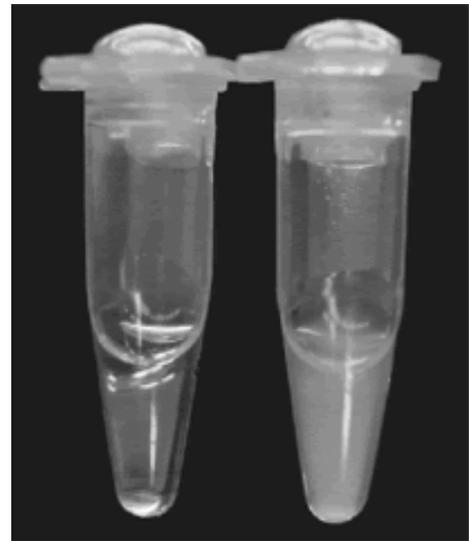


図5 白濁による増幅の有無の確認
左tubeは標的遺伝子なし、右tubeは標的遺伝子あり。標的遺伝子はPSA plasmid DNAで、65℃、60分間の増幅

4. RNAからの1ステップ増幅が可能

標的遺伝子がRNAの場合、従来法ではまず逆転写酵素でcDNAを合成してから増幅反応を行う。しかし、LAMP法の場合は、鎖置換活性をもっているため、逆転写酵素を同時に試薬に添加しておくことにより、DNAの場合と同様に増幅が可能である⁶⁾。

5. 簡易検出が可能

検査、診断用途の場合、結果の信頼性が重要である。従来の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、これが遺伝子検査の煩雑性の一因となっていた。LAMP法は原理的に配列を確認しながら増幅を行っているので、前述したとおり、特異性が極めて高く、結果を増幅の有無で判定可能である。また、増幅産物の量も桁はずれに多いため、簡単な検出手段を選択可能である。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存在下で増幅反応を行えば、紫外線ランプ下で増幅産物を目視可能である⁷⁾。また、DNA合成酵素による伸長反応では副産物としてピロリン酸が生成され、これが反応溶液中のマグネシウムイオンと結合することが知られている。LAMP法では増幅産物の生成量が多いためピロリン酸マグネシウムが溶解度積を越えて白濁・白沈が生じてくる⁸⁾（図5）。これを指標に増幅の有無の肉眼検出が可能であり、白濁（濁度）を機器で測定することも可能で、リアルタイムでも検出ができる。

おわりに

LAMP法の原理は、多少複雑ではあるが、研究者が行

う操作は単純で、サンプル(標的遺伝子)と試薬を60~65℃で、約30分インキュベーションすることで、増幅産物、あるいは増幅の有無を検出することができる簡易、迅速な遺伝子増幅法である。

今後、医療分野で重要になる遺伝子のPOC (point-of-care testing) においては、検体を入手してから30分以内で結果が得られる方法が必要とされている。また、医療分野以外でも試料を入手してその場で遺伝子検査を行う場合など(環境汚染菌の検出など)で迅速性が要求されている。我々はLAMP法により“いつでも、どこでも、だれにでも出来る遺伝子検査”をめざし遺伝子検査の普及に貢献したい。

文 献

- 1) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000), *Nucleic Acid Res.*, **28(12)** : e63
- 2) Nagamine, K., Hase, T. and Notomi, T. (2002), *Molecular and Cellular Probes*, **16** : 223-229
- 3) Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T. and Notomi, T. (2001), *Clinical Chemistry*, **47(9)** : 1742-1743
- 4) Compton, J. (1991), *Nature*, **350(6313)** : 91-92
- 5) Walker, G. T., Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J. G. and Malinowski, D. P. (1992), *Nucleic Acids Res.*, **20(7)** : 1691-1696
- 6) 増渕晴美・納富継宣・岩崎匡臣・長谷 哲 (2000), *生化学*, **72(8)** : 1093
- 7) 富田憲弘・神田秀俊・森 安義・大塚公彦・納富継宣・長谷 哲・森川惇二 (2000), *生化学*, **72(8)** : 1094
- 8) Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T. (2001), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **289** : 150-154

The principle of LAMP method —A simple and rapid gene amplification method—

Hiroshi Ushikubo

EIKEN CHEMICAL CO., LTD Marketing Division Molecular Genetics Team
Munekawa Bldg., 12-8, Ryougoku 1-chome, Sumida-ku, Tokyo 130-0026, Japan
E-mail : lamo@eiken.co.jp
<http://loopamp.eiken.co.jp/>

So far nucleic acid test (NAT) has been employed in various fields, including infectious disease diagnoses. However, due to its complicated procedures and relatively high cost, it has not been widely utilized in many actual diagnostic applications. We have therefore developed a simple and rapid gene amplification technology, Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) method, which has shown prominent results of surpassing the performance of the conventional gene amplification methods. LAMP method acquires three main features : (1) all reaction can be carried out under isothermal conditions ; (2) the amplification efficiency is extremely high and tremendous amount of amplification products can be obtained ; and (3) the reaction is highly specific. Furthermore, developed from the standard LAMP method, a rapid LAMP method, by adding in the loop primers, can reduce the amplification time from the previous 1 hour to less than 30 minutes. Enormous amount of white precipitate of magnesium pyrophosphate is produced as a by-product of the amplification, therefore, direct visual detection is possible without using any reaction indicators and detection equipments. We believe LAMP technology, with the integration of these features, can rightly apply to clinical genetic testing, food and environmental analysis, as well as NAT in different fields.