The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Loop-mediated isothermal amplification of DNA
Author(s)	納富, 継宣
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43151
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【56】

氏　　名	納（のう）　富（とみ）　継（つぐ）　宣（のり）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16491　号
学位授与年月日	平成13年8月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学　位　論　文　名	Loop-mediated isothermal amplification of DNA （DNAのループ介在等温増幅法）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　網野　信行 （副査） 教　授　長田　重一　　教　授　辻本　賀英

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

遺伝子検査に用いられている手法は、未だ特殊技術の域を脱せず、高価で煩雑なものであり、普及の障害となっている。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の増幅である。PCR（polymerase chain reaction）法は最も広く普及しているが、温度コントロール装置（サーマルサイクラー）が必要となる。また遺伝子検査用途の場合、検査の信頼性が要求されるが、PCRは2つの領域の認識で反応を行うので特異性の保証が難しく、検出には別途プローブを用いた検出反応を行わなければならず、検査全体としての煩雑性をともなう。そこで、等温で1種類の合成酵素のみで増幅反応を行わせることにより、診断技術として特に重要視される特異性と増幅効率が高い非常に簡単な新規遺伝子増幅法を考案した。この新規遺伝子増幅法は、一定温度下にプライマーが結合出来る1本鎖DNAループ構造を利用した方法であることから、LAMP法（loop-mediated isothermal amplification）と命名された。

【方法ならびに成績】

1．LAMP法の反応機構

LAMP法は鎖置換合成を行う1つのDNA polymeraseと1対のinner primerと1対のouter primerを利用している。inner primerは、増幅領域の両端に位置する配列を3'末端に持ち、5'末端にその配列の内側の領域と同一配列を持つ構造をしている。まずinner primerで合成を開始し、この合成伸長鎖をouter primerにより、1本鎖として遊離させる。これを鋳型に、対となるinner primerとouter primerで同様の鎖置換合成伸長反応を行い、1本鎖として遊離させる。この1本鎖DNAは両側の末端部分がループを形成し、ダンベル型構造となる。この構造は、以下の反応の起点構造となる。この分子内でDNA鎖が自己結合した構造の3'末端からDNA合成が起こり、更に1本鎖ループ部分にinner primerがアニールし、プライマーからのDNA合成が続いて起こる。この行程が繰り返しおこり、その間に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。

2．LAMP原理の確認

鋳型DNAとしてM13ファージDNAを使用し本反応の原理を確認した。鋳型DNA、4種のオリゴヌクレオチドプライマー、及び基質であるdNTPsを含む反応溶液を95℃、5分間加熱後、氷冷し、鎖置換型DNAポリメラーゼである*Bst* DNA polymeraseを添加し、65℃で1時間反応させた。反応液の一部をアガロースゲル電気泳動し、SYBR Green I染色した。その結果、原理から予想される通り、ラダー状の泳動パターンを示した。この増幅産物を

増幅領域内を認識する制限酵素 *Bam* HI, *Pst* I, 及び *Pvu* II で切断すると、予想されるサイズのバンド数本に集約された。また、増幅領域内部を認識するプローブ（M13-281、M13-333）を用いてのサザンブロット、及び増幅産物をゲルより切り出して、クローニング後シークエンスすることで、増幅産物が鋳型由来であること、原理通りの互いに相補的な配列が交互に連結された構造を持っていることを確認した。

3．感度及び特異性

鋳型として、HBV 配列を持つプラスミド DNA を用い、60℃、1 時間反応させた。10コピー以下の鋳型 DNA を検出でき、従来の遺伝子増幅法と遜色ない感度をもつことが明らかとなった。また、100ng のゲノム DNA 存在下に増幅反応を行った場合でも特異的な DNA 増幅が起こり、鋳型以外の DNA が大量に存在していても微量の DNA を高効率に検出が出来ることがわかった。これは使用した inner primer と同じ領域を用いて nested PCR を行ったときと同等の感度を示した。本増幅法は、原理上、鋳型上の 6 つの領域を認識して増幅するため、特異性がきわめて高くなると考えられた。

4．RNA からの増幅

逆転写酵素も鎖置換合成を行うことが知られている。LAMP 反応の最初のステップを逆転写酵素で行えば、以降は反応の鋳型は DNA であるので、DNA からの増幅反応組成に単に逆転写酵素を添加することで、1 ステップで鋳型 RNA からの増幅も可能と考えられた。前立腺特異抗原（PSA）産生細胞（LNCaP）を、PSA 非産生細胞（K562）にて希釈して総 RNA 抽出後、これを鋳型 RNA とし LAMP 反応（RT-coupled LAMP）を行ったところ、100万個中に 1 個しか存在しない PSA 生産細胞を検出可能であった。従って、本法は DNA からの増幅のみならず、RNA からの増幅においても、高い効率にて増幅を行えることがわかった。

【総括】

LAMP 法は以下の特徴を持つことが確認された。1）6 領域を認識するために特異性が高い。2）増幅効率が高く、短時間に増幅可能である。3）増幅産物は特徴的な構造を有する。4）等温で反応が進行するため、一度プライマーを決定すれば、反応自体は機器を含め極めて簡易に行える。5）逆転写酵素を追加するだけで、RNA からの増幅も DNA と同様に簡単に高効率で行うことが可能である。

論文審査の結果の要旨

遺伝子検査に用いられている手法は、未だ特殊技術の域を脱せず、高価で煩雑なものであり、普及の障害となっている。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の増幅である。

納富継宣君は、等温で 1 種類の合成酵素のみで増幅反応を行わせることにより、診断技術として特に重要視されている特異性と増幅効率が高い非常に簡単な新規遺伝子増幅法（LAMP 法）を考案した。鋳型 DNA としてM13ファージ DNA を使用し本反応を行い、増幅産物を制限酵素切断、サザンブロット、及びクローニング後シークエンスすることで、増幅産物が鋳型由来であること、原理通りの互いに相補的な配列が交互に連結された構造を持っていることを確認した。また LAMP 法は以下の特徴を持つことが確認された。1）6 領域を認識するために特異性が高い。2）増幅効率が高く、短時間に増幅可能。3）等温で反応が進行するため、一度プライマーを決定すれば、反応自体は機器を含め極めて簡易に行える。4）逆転写酵素を追加するだけで、RNA からの増幅も DNA と同様に簡単に高効率で行うことが可能である。

以上のことから納富継宣君の研究は学位に値するものと考える。